

Université de Montréal

Identification des mécanismes de résistance de *V. cholerae* aux peptides antimicrobiens.

par Marion Sarrias

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de MSc
en microbiologie et immunologie

Janvier, 2020

© Marion Sarrias, 2020

Résumé

L'organisation mondiale de la santé estime que le choléra entraîne 100, 000 décès par an pour environ 4 millions de cas recensés, plaçant ainsi cette maladie comme un enjeu de santé publique majeur. Cette infection est causée par *Vibrio cholerae*, une bactérie à Gram négatif vivant en milieu aquatique. Face à cette agression, l'épithélium intestinal et les bactéries du microbiote agissent comme une barrière, en exprimant notamment des peptides antimicrobiens (PAM). *V. cholerae*, comme de nombreux pathogènes, montre une résistance accrue aux PAM. Malgré une avancée constante sur la compréhension des mécanismes de résistances bactériens aux PAM, de nombreuses inconnues demeurent, principalement en raison des techniques de mutagenèse aléatoire utilisées pour leur identification.

L'objectif de cette étude est d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance impliqués dans la résistance de *V. cholerae* aux PAM. Grâce à des expériences de séquençage par spectrométrie masse suivi d'études bio-informatiques, nous avons identifié les protéines OmpV et Lap comme des candidates intéressantes pour être impliquées dans la résistance de *V. cholerae*. Alors que la souche *V. cholerae* A1552 délétée du gène *ompV* ($\Delta ompV$) ne semble pas présenter de défaut de croissance ou de perméabilité, nos résultats ont montré une diminution des concentrations minimales inhibitrices en différents PAM tels que LL-37. Les tests fonctionnels semblent suggérer l'implication des vésicules de sécrétion dans le mécanisme de d'OmpV face à LL-37 chez *V. cholerae*.

Mots-clés : *Vibrio cholerae*, peptides anti-microbiens, résistance bactérienne, vésicules de sécrétion

Abstract

According to the World Health Organization, cholera remains a significant health problem, causing 100,000 death per 4 millions infections per year. *V. cholerae*, the etiologic agent of cholera and a Gram-negative bacterium, is generally transmitted via contaminated food or water. During infection, the microbiota and intestinal epithelium acts as a barrier by producing antimicrobial peptides (AMP). Resistance to AMP has emerged as a virulence factor in pathogens and specifically in *V. cholerae*. As AMP are considered as novel molecular therapeutic agents, it is truly important to better understand strategies of resistance of *V. cholerae*.

The aim of this study is to identify unknown mechanisms involved in *V. cholerae* resistance to AMP. For this purpose, after protein sequencing by mass spectrometry (MS-MS) and bioinformatics, we identified the OmpV porin, member of the outer membrane protein family and the Lap protease as new protein candidates for strategies of resistance. We characterized the *V. cholerae* A1552 strain deleted for *ompV* ($\Delta ompV$). We confirmed OmpV implication in AMP resistance by minimum inhibitory concentration and did not observed any differences in growth or permeability in the presence of AMP between the wild-type (wt) and the ($\Delta ompV$) strains. The work presented here suggest an implication of outer membrane vesicles in *V. cholerae* resistance mechanisms to some AMP as LL-37.

Keywords : *V. cholerae*, antimicrobials peptides, bacteria resistance, outer membrane vesicles

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
1. Introduction.....	1
1.1. <i>Vibrio cholerae</i>	2
1.1.1. Epidémiologie.....	2
1.1.2. Nomenclature.....	3
1.1.3. Cycle de vie.....	4
1.1.3.1. Environnement aquatique.....	4
1.1.3.2. Colonisation du système digestif de l'hôte.....	10
1.1.3.3. Sortie de l'hôte.....	13
1.1.4. Facteurs de virulence.....	14
1.1.4.1. Toxine cholérique (TC).....	14
1.1.4.2. Le pilus co-régulé à la toxine (TCP).....	16
1.1.4.3. Mobilité.....	17
1.1.4.4. Porines.....	18
1.1.4.5. Mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens.....	18
1.1.4.6. Régulation des facteurs de virulence.....	19
1.2. Mécanismes de défenses de l'hôte.....	22
1.2.1. Mécanismes physiques et chimiques non spécifiques.....	22
1.2.2. Immunité innée.....	29
1.2.3. Immunité adaptative.....	32
1.3. Peptides antimicrobiens.....	33

1.3.1.	Mode d'action des PAM	34
1.3.1.1.	Perméabilisation de la membrane	34
1.3.1.2.	Mécanismes à la membrane	35
1.3.1.3.	Inhibition des mécanismes cytosoliques	35
1.3.1.4.	Immunomodulation des PAM.....	36
1.3.2.	Mécanismes de résistance aux PAM chez les bactéries à Gram-négatif	37
1.3.2.1.	Systèmes de réponse au stress.....	37
1.3.2.2.	Modification de la charge membranaire	38
1.3.2.3.	Dilutions des PAM.....	39
1.3.2.4.	Digestion des PAM.....	41
1.3.2.5.	Formation de biofilms.....	42
1.3.2.6.	Capsule.....	42
1.4.	Problématique et objectifs :	43
2.	Matériels et Méthodes :.....	46
2.1.	Souches bactériennes et conditions de culture :	47
2.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices :	47
2.3.	Isolement des vésicules de sécrétion :	47
2.4.	Test de protection aux vésicules de sécrétion :	48
2.5.	Cytométrie en flux :	48
2.6.	Infection de <i>Drosophila melanogaster</i> :	49
3.	Résultats :	50
3.1.	Identification de protéines impliquées dans des mécanismes de résistance aux PAM chez <i>V. cholerae</i> O1 El Tor A1552.....	51
3.2.	Caractérisation du mutant $\Delta ompV$	54
3.2.1.	Caractérisation de la croissance de la souche A1552 sauvage et $\Delta ompV$	54
3.2.2.	Concentrations minimales inhibitrices.....	57
3.3.	Identification du mécanisme de résistance de <i>V. cholerae</i> aux PAM via OmpV	63
3.3	Caractérisation du rôle de OmpV dans la virulence de <i>V. cholerae</i>	70
4.	Discussion	73
4.1.	Identification des protéines impliquées dans les mécanismes de résistance aux PAM	75
4.2.	Caractérisation du mutant $\Delta ompV$	76

4.3.	Identification des mécanismes de résistance d'OmpV aux PAM chez <i>V. cholerae</i> .	78
4.4.	Caractérisation du rôle de OmpV dans la virulence de <i>V. cholerae</i> .	79
5.	Conclusion	81
Bibliographie		i

Liste des tableaux

Tableau I. Conditions de culture pour l'identification de protéines d'intérêts.

Tableau II. CMI en LL-37 et PmB pour les souches *V. cholerae* A1552 sauvage et mutante $\Delta ompV$.

Liste des figures

Figure 1 : Nomenclature de *V. cholerae*.

Figure 2 : Colonisation de l'intestin par *V. cholerae*.

Figure 3 : Toxine cholérique.

Figure 4 : Régulation de l'expression de la TC et du TCP.

Figure 5 : Voie de régulation du Quorum-sensing (QS).

Figure 6 : Les mécanismes cytoplasmiques, cibles de peptides anti-microbiens chez les bactéries.

Figure 7 : Mécanisme de modification de la charge membranaire de *V. cholerae*.

Figure 8 : Dilution des PAM via Bap1 à la surface des OMV.

Figure 9 : Quantification de la porine OmpV dans la portion sécrétée chez *V. cholerae* en présence ou non de différents PAM.

Figure 10 : Concentrations minimales inhibitrices en polymyxine B (PmB) pour les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$).

Figure 11 : Concentrations minimales inhibitrices en LL-37 pour les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$).

Figure 12 : Concentrations minimales inhibitrices en β -Défensines pour les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$).

Figure 13 : Croissance des souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$).

Figure 14 : Croissance des souches *V. cholerae* en présence de différentes concentrations en LL-37.

Figure 15 : Croissance des souches *V. cholerae* en présence de différentes concentrations en PmB.

Figure 16 : Stratégie d'analyse.

Figure 17 : Evaluation de la perméabilité membranaire avec les marqueurs SYTO 9 et IP par la cytométrie en flux.

Figure 18 : Gel SDS-PAGE des solutions de vésicules purifiées *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante $\Delta ompV$.

Figure 19 : Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion en présence de LL-37.

Figure 20 : Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion en présence de PmB.

Figure 21 : Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion à concentration (1/10X) en présence de LL-37.

Figure 22 : Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion à concentration (1/10X) en présence de PmB.

Figure 23 : Mise au point expérimentale de la caractérisation du rôle de OmpV dans la virulence de *V. cholerae*.

Figure 24 : Organisation génique de l'opéron *ompV/vprA/vprB*

Liste des abréviations

%	Pourcent
μl	Microgrammes
μg	Microlittres
°C	Dégrés Celsius
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acides desoxy-ribonucléiques
ADP-ribose	Adénosine di-phosphate ribose
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
Bap1	<i>Biofilm associated protein 1</i>
c-di-GMP	Di-guanosine monophosphate cyclique
cAMP	Adénosine mono-phosphate cyclique
CBP	<i>Chitin binding protein</i>
Cl-	Chlorure
CMI	Concentration minimale inhibitrice
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
D. O	Densité optique
Da	Daltons
$\Delta ompV$	Souche <i>V. cholerae</i> A1552 O1 El Tor délété du gène <i>ompV</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Réticulum endoplasmique
Fructose-6-P	Fructose-6-phosphate
g	Gravité
GbpA	<i>GlcNAc binding protein A</i>
GlcNAc	β -1,4-linked N-acetylglucosamine
Gs	Sous-unité de la protéine Gs
H ₂ O	Eau
HCl	Acide chloridrique
IgA	Immunoglobuline A
IP	Iodure de propidium
kDa	Kilo-Daltons
l	Litres
LB	Milieu Luria-Bertani
LPLUNC1	<i>Long palate, lung and nasal epithelium clone 1 protein</i>
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligrammes
ml	Millilitres
mM	Millimolaire
MSHA	<i>Mannose sensitive haemagglutinin</i>

NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	Cellules <i>Natural Killer</i>
nm	Nanomètres
NPN	N-phenyphthalmine
OMP	<i>Outer membrane proteins</i>
OMV	<i>Outer membrane vesicles</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAM	Peptides antimicrobiens
PB	Milieu <i>Poor Broth</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Potentiel hydrogène
PmB	Polymixine B
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
QS	<i>Quorum-sensing</i>
RbmA	<i>Rugosity and biofilm modulator A</i>
RbmC	<i>Rugosity and biofilm modulator C</i>
RGD	Acide arginylaspartique
rpm	Rotation par minute
RTA	Réponse de tolérance à l'acidité
s.u	Sans unité

SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
TC	Toxine cholérique
TCA	Sous-unité A de la toxine cholérique
TCB	Sous-unité B de la toxine cholérique
TCP	Pilus co-régulé à la toxine
TNF	Facteur de nécrose tumorale
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VNC	Viable mais non cultivable
VPI	Ilot de virulence
VPS	<i>Vibrio</i> exopolysaccharides

A l'amitié

« Parfois dans les moments difficiles, tout semble s'écrouler, le monde glisser sous nos pieds. C'est dans ces moments- là qu'il faut chercher au fond de soi la force de résister. Surtout ne pas se laisser aller, croire en nous. Parce que tous, sans exception sommes capable de nous relever et de nous battre contre ces moments qui nous font tant douter »

Anonyme

Remerciements

Je remercie **Dre Marylise Duperthuy** de m'avoir fourni le matériel biologique et les équipements nécessaires à la réalisation de ce projet.

J'envoie ma reconnaissance au **Dr. Hugo Soudeyns** pour sa patience et sa bienveillance. Vous avez été d'un grand soutien durant tout ce parcours.

Je remercie le **Dr Szatmari** et **Dre Maurice** pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire, leur disponibilité et pour toutes leurs recommandations.

Je remercie également le comité organisateur de **RéseauLab**, de la **journée de la recherche** et les membres de l'**AGEMIUM** aux côtés de qui je me suis beaucoup épanouie durant les organisations d'événements.

Durant tout mon parcours et toute la rédaction de ce mémoire, je n'ai cessé de me dire combien j'étais chanceuse d'être si bien entourée ...

J'envoie donc toute ma reconnaissance et mon amour :

A **mes parents** dont je suis extrêmement fière et qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes choix. Merci pour tout l'amour que vous me donnez qui me permet de croire en moi et d'avancer.

A **Sean** et ma **Candicous** chéris. Les mots me manquent pour vous témoigner mon immense gratitude. On aura toujours ri ! Vous êtes incroyablement présents, je me demande ce que je ferais si vous n'étiez pas là ! Merci **ma Candicous** d'être si douce et prévoyante, être avec toi c'est comme être dans un gros plaid. Merci **Sean**, pour avoir été si patient avec moi, de toujours essayer de me protéger, de me pousser vers l'avant.

A **Alisson**, merci de tout vivre avec moi : joies, peines et beaucoup de bêtises mais durant lesquelles on rit toujours ! Je me demande ce que je ferais sans toi ! Je suis très fière de la battante que tu es.

A **Marine**, merci pour tous tes conseils, pour toutes ces soirées enflammées et ces longues discussions. Merci d'être la petite voie raisonnable sur mon épaule !

A **Anais** et **Emmanuelle**, merci pour votre si grand cœur où je me réchauffe toujours. Même si loin physiquement, vous êtes d'un soutien incroyable. Merci pour tout votre amour. J'ai une profonde admiration pour les deux femmes et mamans que vous êtes. Un merci particulier et immense à **Anais** qui a fait de moi une marraine très fière !

A **Camille et Anne-So**, j'ai tellement appris de toi ma bibichette, merci de savoir tant me rassurer. Le monde irait mieux si l'on avait tous la chance d'avoir une Camille à ses côtés ! Et puis **Anne-So**, ma petite crevette d'eau douce merci de me guider avec tes conseils, j'espère que tu sais qu'ils sont précieux pour moi.

A **Séb**, merci de me faire tant rire, merci de te chamailler avec moi et de me tirer les oreilles quand il le faut. J'espère que tu sais la grande place que tu as dans mon cœur ... **et aussi à tous mes copains de master Flo, Salim, Juju, Guigui, Dede, Yaya que je n'oublie pas** où qu'ils soient ...

A **Nadia** merci pour être si bienveillante avec moi, et pour être dans tous les cas cette oreille attentive.

A **Claire et Fréd**, merci pour toutes nos discussions et tous vos conseils. Votre opinion est toujours très importante pour moi.

A **Cindy** merci pour tous nos moments passés ensemble, nos soirées canap' ton écoute et ta relecture.

J'embrasse bien bien fort **Raphaëlle, Clément, Antoine, Fred Duval, Salix, Dave et Livia.**

Et pour finir, j'envoie tout mon amour à mon filleul, **Simon** qui est un petit garçon si curieux et intelligent. Je suis extrêmement fière de toi et d'être ta marraine **mon Simsim**. J'envoie également tout mon amour à mes petits neveux et nièces d'adoption **Victor**, ma **Capupu** et **Auguste** ! Vous êtes mes soleils ! Vous avez des parents merveilleux !!!

1. Introduction

1.1. *Vibrio cholerae*

1.1.1. Epidémiologie

L'organisation mondiale de la Santé estime que le choléra entraîne entre 100,000 et 120,000 décès par an pour 3 à 5 millions de cas recensés, plaçant ainsi cette maladie comme un enjeu de santé publique majeur ^{1, 2}. Le choléra se propage via l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée par une bactérie à Gram-négatif, monotriche et très mobile : *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) ³. Cette bactérie a été isolée pour la première fois en 1884 par Robert Koch⁴. Le choléra touche de nombreuses zones dans le monde principalement en Asie et en Afrique ⁵. La maladie se manifeste sous forme d'épidémies ou d'endémies ⁶. Une endémie se caractérise par la présence d'un nombre régulier de cas pendant une période donnée dans une zone géographique définie. Dans le cas du choléra, le Bangladesh est une zone endémique importante ⁷. A contrario, les épidémies sont définies comme une émergence de cas dans des zones inhabituelles ⁶. Elles font souvent suite à des catastrophes naturelles telles que cela a été reporté en Haïti en 2010 ^{8,9}. Parmi les différents cas rapportés, le degré de sévérité est variable : du cas asymptomatique au cas mortel. Les cas mortels sont rares, avec un taux de décès de 0,03%. Dans ces cas-là, ce sont les pertes de fluides importantes (plusieurs litres par jour) et la déshydratation du patient qui conduiront au décès ⁹. Les facteurs qui peuvent influencer la sévérité de la maladie sont l'âge du patient, des facteurs génétiques, l'immunité, l'inoculum (quantité de bactéries ingérées) ou encore la qualité de la barrière gastrique. La présence d'abondantes diarrhées aqueuses est due à la sécrétion par la bactérie d'une toxine, la toxine cholérique (TC) ¹. A ce jour, le traitement des cas de choléra représente toujours un enjeu de santé publique. En effet, le traitement repose sur une

réhydratation orale et intraveineuse alors que les cas de choléra se manifestent dans des zones où l'accès à l'eau potable est limité.¹⁰

1.1.2. Nomenclature

V. cholerae est une gammaprotéobactérie de la famille des Vibrionaceae et du genre *Vibrio*. Les espèces de *V. cholerae* sont classifiées en plus de 200 sérogroupes dont deux seulement ont la capacité à produire la TC, caractéristique du choléra : O1 et O139. Les sérogroupes se distinguent selon la structure et la composition de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS)¹¹. A l'intérieur d'un même séro groupe, les souches sont divisées en biotypes selon des paramètres physiologiques et biochimiques tels que la résistance à la polymyxine B (PmB)¹², la séquence de certains gènes, des tests d'hémolyse¹³, des tests de sensibilité aux phages ou encore via la réaction de Voges-Prokauer, (**Figure 1**)¹⁴. Parmi le séro groupe O1, par exemple, on distingue les biotypes classiques et El Tor. Ces biotypes sont eux-mêmes divisés en 3 sérotypes : Inaba, Ogawa et Hikojima. Ces sérotypes se différencient par la présence à la surface des souches de différents antigènes : A, B et C (**Figure 1**). Les sérotypes Inaba et Ogawa présentent respectivement l'antigène C et B¹⁵ et partagent l'antigène A alors que le sérotype Hikojima présente les antigènes A, B et C (**Figure 1**)¹⁶.

Ce sont uniquement les souches O1 El Tor et classiques ainsi qu'O139 qui ont été rapportés comme étant impliquées dans des cas de choléra. Les souches *V. cholerae* O1 classiques ont été responsables des six premières pandémies de 1889 à 1923 alors que l'actuelle septième pandémie est causée par une souche *V. cholerae* O1 El Tor¹⁷. En parallèle, au début des années 90, des cas de choléra avec la souche *V. cholerae* O139 ont été recensés.¹⁸

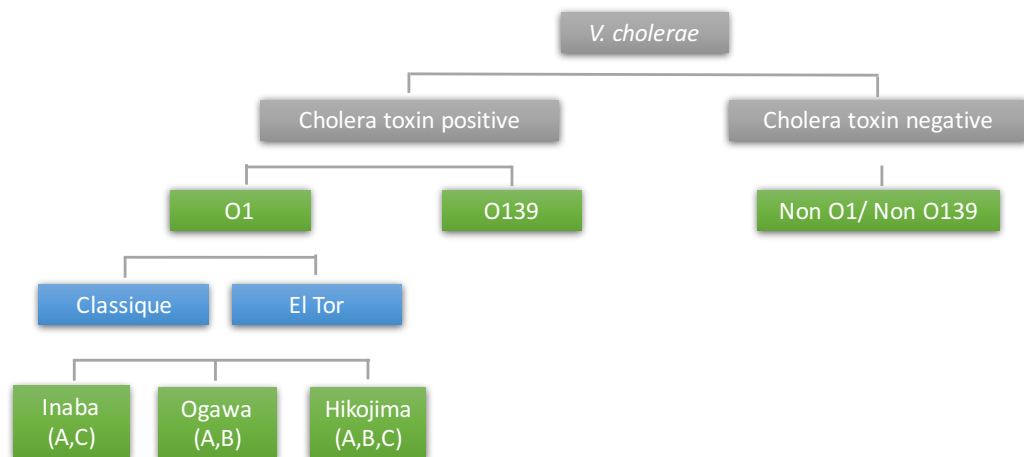


Figure 1: Nomenclature *V. cholerae*- *V. cholerae* est soumis à une classification précise. En fonction de si les souches sont capables de produire ou non la toxine cholérique. Ensuite les souches se distinguent en fonction de leur sérotype (en vert) et de leur biotype (en bleu). Adapté de Safa *et al.* (2010)

1.1.3. Cycle de vie

V. cholerae, comme les autres membres de sa famille des Vibrionaceae, est une bactérie saprophyte en milieu aquatique. *V. cholerae* est également une bactérie pathogène intestinale spécifique de l'Homme. De ce fait, la bactérie a évolué pour pouvoir s'adapter et persister dans différents environnements ¹⁹.

1.1.3.1. Environnement aquatique

V. cholerae est une bactérie aquatique présente dans les lacs, les estuaires ou encore les eaux saumâtres. Dans cet environnement, on la retrouve principalement associée au zooplancton qu'elle parasite. Comme l'abondance du zooplancton suit celle du phytoplancton, il n'est pas surprenant d'observer une corrélation entre les flambées

endémiques de choléra et la prolifération d'algues dans différentes régions, dont le Bangladesh ²⁰. Ainsi, l'environnement aquatique représente un véritable réservoir de *V. cholerae* où de nombreux paramètres biologiques et physiques régulent la survie et l'abondance de la bactérie comme des conditions salines ou de températures parfois extrêmes ou encore la présence de prédateurs ^{21,22}.

Pour faire face à ces conditions particulières, *V. cholerae* utilise différents mécanismes d'adaptation.

1- Utilisation de la chitine

Tout d'abord, la bactérie s'associe à des surfaces biotiques comme le zooplancton, le phytoplancton, ou abiotiques qui constitueront des sources de nutriments. En effet, *V. cholerae* est capable de se lier spécifiquement à la chitine ²³. La chitine est un biopolymère comparable à la cellulose, insoluble et très abondant dans le milieu aquatique ²⁴. Elle est composée de chaînes de résidus liés β -1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc). Ainsi, la chitine sera dégradée par *V. cholerae*. Cette dégradation conduit à la consommation des produits finaux : acétate, ammoniacque et fructose 6-phosphate (fructose 6-P) par la bactérie. Tout ceci implique la mise en marche d'une cascade de réponse génique et une douzaine d'enzymes soumis à une régulation fine ²³. La bactérie dispose d'un système senseur qui permet la transcription des gènes de la chitinolyse spécifiquement en présence de chitine. Dans ce système, différentes protéines sont impliquées : une chitinase extracellulaire, CBP (*chitin binding protein*) qui est une protéine de liaison aux résidus de chitine et enfin une protéine senseur ChiS. Dans un environnement pauvre en chitine, la CBP est liée au domaine périplasmique de la protéine senseur ChiS et verrouille celle-ci. Au contraire, quand l'environnement externe est riche en chitine, la chitinase extracellulaire dégrade la chitine en résidus (GlcNAc)_n et ces résidus sont importés au périplasme via une chitoporine

spécifique. CBP se lie à ses résidus et libère la protéine senseur ChiS. Une transduction du signal entraîne alors l'induction des gènes de la chitinolyse et la consommation de ces produits sous le contrôle de ChiS ²⁵.

In fine, l'utilisation de la chitine est bénéfique pour *V. cholerae* sur différents plans : gain d'énergie, mise en marche de réponse cellulaire comme l'induction de compétence ou encore la formation de biofilms ²⁶.

2- Formation de biofilms

Un autre mécanisme augmentant la résistance de *V. cholerae* aux stress est la formation de biofilms ²⁷. Les biofilms sont définis comme un ensemble de bactéries attachées à une surface biotique ou abiotique et englobées dans une matrice polymérique. Différents éléments peuvent réguler la formation de biofilms comme la disponibilité en nutriments, l'osmolarité du milieu, la salinité, mais aussi la disponibilité en phosphate. Les principales voies de régulation sont le *quorum-sensing* (QS) et la voie du di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) ²⁸. Le développement de biofilms implique (i) l'attachement initial, (ii) la formation de structures tridimensionnelles et enfin (iii) la dispersion ²⁷.

- (i) Dans un premier temps, *V. cholerae* établit un premier contact avec la surface dit « attachement initial ». Des premiers contacts transitoires sont établis entre les bactéries et la surface grâce aux forces électrostatiques et/ou de Van der Waals. Ces forces attirent la bactérie et entraînent des mouvements rotatifs. Ensuite, la bactérie utilise principalement un pili de type IV, le *mannose sensitive haemagglutinin* (MSHA) pour scanner la surface cible et établir des liaisons fortes et spécifiques ²⁹. La délétion de *mshA*, codant la principale sous

unité protéique du pili MSHA de type 4, entraîne une perte importante d'adhérence ²⁹. D'autres éléments de surface sont également impliqués dans la formation de ces liaisons fortes et spécifiques, comme la protéine de membrane externe GlcNAc *binding protein* A (GbpA) ou encore le flagelle ²⁹.

- (ii) Une fois attachées aux surfaces, la formation de la structure tridimensionnelle des biofilms nécessite la formation de microcolonies (multiplication bactérienne) concomitante à la production de la matrice extracellulaire. Le principal composé de cette matrice est le *Vibrio* exopolysaccharides (VPS), qui est excrété par les bactéries tout au long de la formation des biofilms. Deux groupes de gènes sont impliqués dans la synthèse de ces composés : *vps-I*, qui contient les gènes *vpsA* à *vpsK*, et l'opéron *vps-II*, qui contient les gènes *vpsL* à *vpsQ* ³⁰. Des protéines sont également nécessaires : RbmC (*Rugosity and Biofilm Modulator C*), RbmA (*Rugosity and Biofilm Modulator A*) et Bap1 (*Biofilm Associated Protein 1*) ²⁷. RbmA s'accumule aux pôles de la cellule bactérienne et permet suite à la division cellulaire aux cellules filles de rester attachées à la cellule mère. Bap1 serait sécrétée continuellement par la cellule mère et en s'accumulant à l'interface cellules-surfaces permettrait l'adhésion aux surfaces. RbmC est produite et sécrétée plus tardivement, en association avec Bap1 et VPS. Elle crée alors une enveloppe autour des cellules pour former des amas. Cette enveloppe est extensible et permet la croissance des cellules. En parallèle, les cellules continuent de se diviser, formant ainsi les microcolonies à l'intérieur de la matrice ³¹.

- (iii) La dernière étape dans le développement des biofilms est la dispersion, qui consiste en le détachement des cellules vers le milieu environnant. Cette étape est essentielle dans le cycle de vie de la bactérie pour sa diffusion, sa survie mais aussi la transmission de la maladie ³². Deux nucléases cellulaires, Dns et Xds, ainsi qu'une lyase qui permettraient la dégradation de VPS et seraient cruciales dans la dispersion des biofilms ont été identifiées ^{28,33}.

Ainsi ces structures particulières via de nombreux canaux perméables permettent à *V. cholerae* un accès aux nutriments, mais aussi la protection face aux agents antimicrobiens ou aux variations de température ²⁸.

3- Passage à l'état VNC

Un autre mécanisme de résistance de *V. cholerae* aux conditions drastiques environnementales est le passage des cellules à un état dit viable mais non cultivable (VNC) ^{34,35}. Les cellules VNC sont des cellules vivantes, mais qui ne sont pas capables de croître dans leur milieu conventionnel. Elles présentent une activité métabolique ralentie. Ce passage à l'état VNC résulte de conditions extrêmes, telles qu'une privation de nutriments ou d'une exposition à des températures extrêmes et est réversible. En effet, dans un environnement plus favorable, comme le système digestif humain où *V. cholerae* pourra retrouver un métabolisme actif ³⁴.

4- Résistance face aux prédateurs

En outre, *V. cholerae* dispose de systèmes pour le protéger face aux prédateurs présents dans l'environnement. Les prédateurs de *V. cholerae* sont divers comme des protozoaires, bactérioplancton, des phages ou d'autres espèces bactériennes^{20, 24}.

Premièrement, la bactérie dispose d'un taux de croissance élevé, environ deux fois supérieur à d'autres bactéries aquatiques. Ensuite, *V. cholerae* sécrète des facteurs comme par exemple PrtV qui est une protéase dont l'expression est sous le contrôle de la voie du QS²². Les travaux de Vaitkevicius *et al.* ont montré qu'en présence d'une souche sauvage de *V. cholerae*, on observait une diminution de la viabilité des prédateurs bactériens comme *Cafeteria roenbergensis* et *Tetrahymena pyriformis* en présence de souche *V. cholerae* sauvage, via la protéase PrtV³⁶. A contrario il a été observé avec les souches *V. cholerae* mutantes $\Delta prtV$ ou $\Delta hapR$, HapR étant le régulateur clé du QS chez *V. cholerae*, une diminution importante de la survie bactérienne en présence des prédateurs³⁷. Il a également été montré que la souche *V. cholerae* est capable de survivre et se multiplier dans une amibe telle que *Acanthamoeba castellanii*³⁸. En effet, la bactérie se loge dans la vacuole contractile de l'amibe et regagne son environnement aquatique lors de la lyse d'*A. castellanii*³⁹.

En parallèle, la bactérie dispose de différents mécanismes pour faire face à l'attaque de phages comme la modification de récepteurs membranaires, l'utilisation des vésicules de sécrétion mais aussi la présence de systèmes bactériens tels que le système CRISPR-Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated proteins*)^{40,41}. En effet, ce système qui fonctionne comme un système immunitaire adaptatif permet la reconnaissance spécifique des phages et leur élimination. Ce système se compose d'une part de courtes séquences palindromiques répétées séparées par des séquences courtes appelées spacers, et d'autre part des protéines Cas. Après transcription des séquences courtes en ARN CRISPR, un complexe composé de ces ARN et de la machinerie Cas se forme et dirige alors

le clivage de séquence complémentaire aux séquences d'ARN ⁴¹. Ce système permet alors le clivage d'ADN étranger tel que l'ADN phagique qui se serait intégré dans le génome.

Ensemble, ces mécanismes permettent à *V. cholerae* d'être hautement résistant aux stress rencontrés dans l'environnement aquatique ^{22, 26}.

1.1.3.2. Colonisation du système digestif de l'hôte

En parallèle de son environnement aquatique, *V. cholerae* colonise le système digestif humain via l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée ⁴².

Dans un premier temps, *V. cholerae* doit survivre au passage stomacal. En effet, il est exposé à un pH <2 pendant 20 à 60 minutes alors qu'il est particulièrement sensible à l'acidité. Pour que la colonisation soit possible, la dose ingérée de *V. cholerae* doit être suffisamment importante ⁴³. Par exemple, il est estimé que pour des cellules à l'état planctonique, la dose infectieuse est de 10¹¹ bactéries. Cette dose est diminuée chez certains individus ou encore en fonction de l'état de la bactérie. En effet, la bactérie peut être ingérée sous forme libre, à l'état de microcolonies ou sous forme de biofilms (**Figure 2**) ⁴². A l'état de biofilms, les bactéries sont protégées de l'acidité par la matrice extracellulaire, la dose infectieuse est donc plus basse ⁴⁴.

De plus, même si *V. cholerae* est sensible à l'acidité, il dispose d'une série de mécanismes regroupés sous le terme de réponse de tolérance à l'acidité (RTA) ^{45,46}. Les mécanismes de la RTA comprennent les voies de réponses aux stress telle que la voie de la porine OmpU, des régulateurs transcriptionnels tels que HepA mais aussi des mécanismes pour stabiliser le pH intracellulaire ⁴². Par exemple, CadA est une lysine décarboxylase qui est responsable de la formation de cadavérine et dioxyde de carbone ⁴⁵. Cette production

consomme un proton et permet ainsi de stabiliser le pH ⁴⁵. En parallèle, des protéines chaperonnes sont également produites comme RecO pour protéger les protéines bactériennes de l'acidité ⁴².

Après le passage stomacal, la bactérie atteint l'intestin où se trouve la bile. La bile est une solution bactéricide qui agit comme un véritable répulsif et chasse *V. cholerae* vers l'épithélium intestinal où elle est présente en moindres concentrations (**Figure 2**) ⁴⁷. Comme chez de nombreux pathogènes, la bile contrôle l'expression des facteurs de virulence tels que la TC ou encore le pilus corégulé à la toxine (TCP) chez *V. cholerae*. En effet, les acides lipidiques qui y sont retrouvés inhibent l'activité de ToxT, le régulateur majeur de la virulence (cf section 1.5.6, **Figure 4**) ^{48, 49}. Cette inhibition est profitable pour la bactérie puisque celle-ci n'exprimera les facteurs de virulence que lorsqu'elle aura atteint sa niche : l'épithélium intestinal ^{42,49}. De plus, la bile induit l'expression des porines comme OmpU et OmpT qui sont essentielles à la survie de *V. cholerae* dans cet environnement ⁵⁰.

L'épithélium intestinal est quant à lui recouvert d'un gel visqueux : le mucus. D'une épaisseur d'environ 180 µm, il est composé principalement de mucines, qui sont des protéines hautement glycosylées (**Figure 2**) ⁴². A l'approche du mucus, la bactérie produit des mucinases non spécifiques, comme la métallo-protéase Hap qui dégrade les polysaccharides et les protéines des mucines⁵¹. Ensuite, c'est grâce à son flagelle mobile que la bactérie progresse dans le mucus⁵². A l'approche de l'épithélium intestinal, ce sont d'autres mucinases spécifiques qui s'expriment, telles que TagA ⁵³. Ces mucinases permettent de cibler spécifiquement les mucines attachées à la surface épithéliale ⁵³. *V. cholerae* établit un contact intime avec l'épithélium intestinal et peut entamer l'attachement initial (**Figure 2**) ⁴². Différentes adhésines spécifiques ou non spécifiques sont impliquées dans l'attachement de *V. cholerae* sur l'épithélium intestinal mais aussi le flagelle en plus de son rôle dans la mobilité. En effet, lors de la progression dans le mucus, le flagelle est

rompu, indiquant alors à la bactérie son arrivée dans la niche et permettant l'expression d'autres voies de signalisation ⁵². Parmi les adhésines non spécifiques, Mam7 établit des contacts avec la fibronectine ou encore l'acide phosphatidique à la surface des cellules de l'hôte. Mam7 serait impliquée dans l'adhésion de nombreuses bactéries à Gram négatif ⁵⁴. Parmi les adhésines spécifiques, GbpA, qui est également impliquée dans la liaison à la chitine, se lierait spécifiquement aux résidus GlnAc des glycoprotéines présentes à la surface des cellules de l'épithélium intestinal ^{55,56}.

D'autres molécules pourraient être impliquées dans l'attachement, comme les protéines de la membrane externe et notamment OmpU ⁵⁷. En effet, son rôle en tant qu'adhésine a déjà été montré chez *Vibrio fischeri*. Cette protéine se lierait à la fibronectine et au tripeptide RGD présent à la surface des entérocytes ⁵⁸. Cette phase d'attachement est indispensable à la colonisation du système digestif par *V. cholerae* ^{42,55}. Des études ont montré que la délétion de *gbpA* et *frhA* (codant pour une autre adhésine) montrent une diminution drastique de la colonisation chez la souris ⁵⁹.

Après l'attachement à l'épithélium intestinal, la bactérie commence à proliférer (**Figure 2**) ⁶⁰. Lorsqu'une certaine concentration cellulaire est atteinte, l'expression du TCP est permise. Le TCP est un long, flexible homopolymère de sous-unités de TcpA. Il joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, mais aussi dans la formation de liaisons bactéries-bactéries et donc l'auto-agglutination qui conduit à la formation de microcolonies (**Figure 2**). Les différents rôles du TCP seront détaillés en section 1.4.2. Ainsi, des études ont montré qu'une micro-colonie résultait généralement de la multiplication d'une seule cellule. Les cellules filles s'auto-agrégent et forment cette structure particulière. Les micro-colonies permettent à la bactérie d'accroître l'accès à des nutriments mais aussi de se protéger des agents antimicrobiens. C'est sous la forme de ces micro-colonies que les bactéries commenceront

à produire la toxine cholérique responsable des symptômes chez l'hôte décrit plus haut
(Figure 2)^{42, 60}.

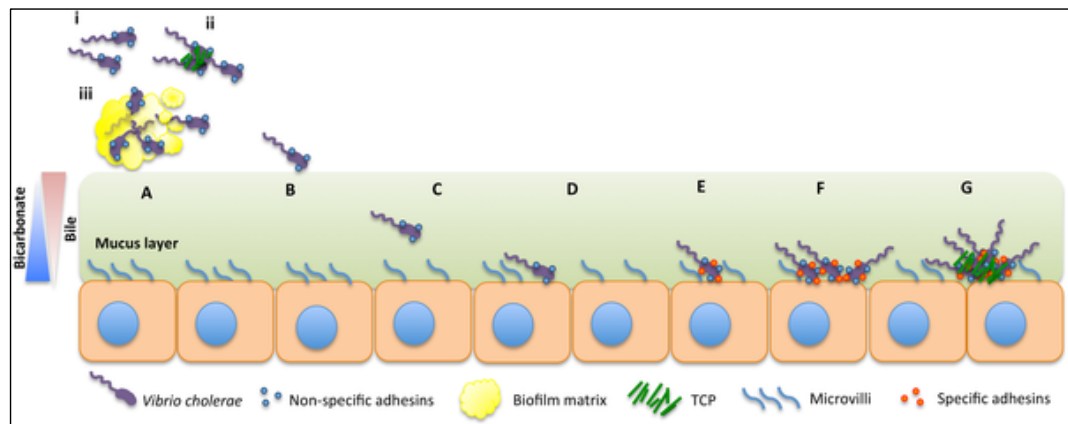


Figure 2: Colonisation de l'intestin par *V. cholerae* - (A) La bactérie *V. cholerae* peut être ingérée à l'état libre (i), sous forme de micro-colonies (ii) ou de biofilms (iii). (B) Les cellules épithéliales intestinales sont recouvertes de mucus. (C) *V. cholerae* traverse ce mucus via son flagelle qui la rend mobile. (D) A l'approche de l'épithélium, le flagelle sera rompu et la bactérie établit un attachement initial puis produits différentes adhésines spécifiques et non spécifiques (E). Les cellules se multiplient (F). Lorsqu'une certaine concentration est atteinte, la TCP est produite permettant la formation de micro-colonies et de la TC (G). De Almagro-Moreno *et al* (2015). *Droits intégraux de reproduction Creative Commons*

1.1.3.3. Sortie de l'hôte

Lorsque la concentration en cellules dans les microcolonies devient trop importante la formation de biofilms et la production des facteurs de virulence sont réprimés^{42,61}. Ces modifications sont hétérogènes dans la population et certaines bactéries continuent à produire la TC qui entraînera la poursuite des diarrhées. Ces modifications conduiront à la sortie de l'hôte de la bactérie⁶². En parallèle, pour se détacher de l'épithélium intestinal, la bactérie utilise une voie de signalisation contrôlée par RpoS. Cette protéine contrôle positivement la production de HapR (cf section 1.5.6), mais aussi des gènes nécessaires à l'assemblage du flagelle (cf. section 1.4.3)⁶³. En parallèle, d'autres voies de régulation, comme celles impliquées dans le métabolisme, la formation de biofilms ou encore la

mobilité sont activées. Ces différentes activations permettront à la bactérie de survivre à la sortie de l'hôte.

1.1.4. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence ont été définis comme les mécanismes utilisés par la bactérie pour se répliquer chez l'hôte, et *in fine* se disséminer. Ils permettent d'affaiblir l'hôte mais aussi de contourner ou renverser ses défenses face à l'infection ⁶⁴. Chez *V. cholerae*, les principaux facteurs de virulence sont la TC et le TCP. Cependant ils ne sont pas les seuls, certains mécanismes comme ceux impliqués dans la résistance aux agents antimicrobiens pourraient être reconnus comme des facteurs de virulence.

1.1.4.1. Toxine cholérique (TC)

La TC, responsable des symptômes chez l'hôte contaminé, est une exotoxine protéique. Cette protéine est l'assemblage de deux sous unités : un exemplaire unique de la sous-unité A (TCA) et cinq exemplaires de la sous-unité B (TCB) ⁶⁵. La sous-unité A est responsable de la toxicité de la molécule et les sous-unités B permettent la liaison aux cellules de l'hôte ⁶⁶. Les gènes qui codent ces sous-unités sont respectivement *ctxA* et *ctxB*, initialement portés par le phage filamenteux CTX et dont le récepteur est le pilus co-régulé à la toxine TCP. Le phage s'est intégré en une (souche El Tor) ou deux copies (souche classique) sur le large chromosome des souches *V. cholerae* O1 ainsi que la souche O139 ⁶⁷, ⁶⁸. Une fois exprimée et assemblée dans le périplasme, la TC est sécrétée par *V. cholerae* et transportée via le système de sécrétion de type II dans le lumen intestinal. La TC se lie aux

cellules intestinales via la liaison de TCB au monosialoganglioside GM1 à leur surface (**Figure 3**)⁶⁹. Ce dernier n'est pas spécifique des entérocytes et ne s'exprime que dans certaines phases du cycle cellulaire : les phases G0/G1⁷⁰. La TC est endocytée et la TCA et la TCB se dissocient au niveau du réticulum endoplasmique⁶⁹. La TCA est ensuite transportée jusqu'au cytosol où elle permet le transfert de l'ADP-ribose du nicotinamide adénine dinucléotide sur une des arginines de la protéine G alpha provoquant et conduisant à l'activation permanente de l'adénylate cyclase (AC). Ceci entraîne alors une augmentation de la concentration en cAMP intracellulaire et un débalancement dans le mouvement d'électrolytes à l'intérieur de la cellule (**Figure 3**)^{69,71}. On observe une augmentation anormale de l'excrétion d'ions Cl⁻ concomitante à une fuite hydrique, entraînant alors d'importantes diarrhées aqueuses chez les patients pouvant aller jusqu'à 2 l/heures (**Figure 3**)⁵.

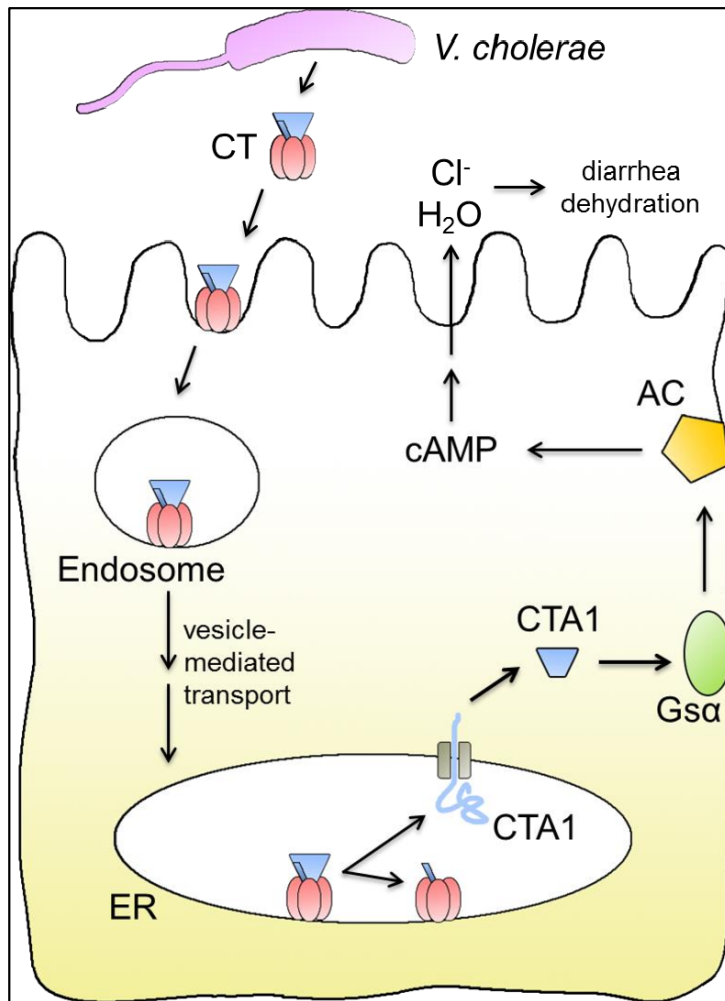


Figure 3: Toxine cholérique

La toxine cholérique est sécrétée par *V. cholerae* à la surface de l'épithélium intestinal l'assemblage de deux sous-unités: un exemplaire de sous-unité A (TCA, en bleu) et cinq exemplaires de sous-unités B (TCB, en rouge). Après liaison au monosialoganglioside GM1 à la surface des entérocytes, la TC est internalisée. La TCA et la TCB se dissocie au réticulum endoplasmique (ER). La TCA entraîne alors l'activation permanente de la protéine GS (vert) et donc l'hyperactivation de l'adénylate cyclase (AC, jaune). La concentration en cAMP est augmentée, provoquant un débalancement dans le mouvement d'électrolytes, entraînant alors d'importantes diarrhées aqueuses et une déshydratation chez le patient. De Vanbennekorn *et al* (2013). Droits intégraux de reproduction Creative Commons

1.1.4.2. Le pilus co-régulé à la toxine (TCP).

Le TCP est un pilus de type IV constitué de la répétition d'une sous-unité TcpA codée par le gène *tcpA*^{72,73}. Le terme « co-régulé » a été employé puisque *in vitro*, les signaux qui induisent l'expression de la TC induisent également l'expression du TCP (cf section 1.5.6). Les fonctions de ce pilus sont multiples. Tout d'abord, le TCP permet l'auto-agrégation de *V. cholerae* et ainsi la formation de structures particulières chez l'hôte qu'on appelle : microcolonies. Ces microcolonies protégeront la bactérie des défenses de l'hôte et permettront la formation de microenvironnement dans lequel la concentration en TC est élevée, la qualifiant alors de facteur de virulence. Historiquement, le TCP a agi comme

récepteur du phage CTX, permettant à *V. cholerae* de recevoir les gènes *ctxA* et *ctxB* qui codent pour les sous-unités de la TC ⁶⁷. Les gènes responsables de la synthèse du TCP sont regroupés en un opéron au sein de l'îlot de virulence (VPI). Parmi ces gènes se trouvent *tcpA*, codant pour la principale sous-unité du TCP, TcpA ⁷⁴.

1.1.4.3. Mobilité

V. cholerae est doté d'un flagelle polaire, divisé en trois composants : le corps basal, le crochet et le filament, qui lui confère sa mobilité. La mobilité est complètement impliquée dans la colonisation de l'hôte puisqu'elle permet à la bactérie de se rapprocher de sa niche, d'établir l'attachement au niveau de l'épithélium intestinal, de contrôler l'expression du TCP et de la TC et enfin de sortir de l'hôte pour la dissémination environnementale ⁵². Il a été montré que l'ingestion de mutants *V. cholerae* non mobiles par des adultes volontaires provoque des symptômes affaiblis ⁵². De plus, des mutants non mobiles montrent une augmentation du niveau de production de TC et de TCP mais aussi de l'expression de la TC et du TCP en dehors de la niche de la bactérie. La mobilité apparaît alors comme un facteur de virulence essentiel à *V. cholerae* ⁵².

L'assemblage de cette structure est soumis à une régulation génique fine à 4 étages ⁷⁵. En effet, l'unique gène de classe I permet la synthèse de FlrA, qui active les gènes de classe II permettant la synthèse de l'appareil MS et les composants du système FlrBC. A son tour, FlrC sous sa forme phosphorylée active les gènes de classe III qui permettent la synthèse du corps basal, du crochet et de la flagelline FlaA. Finalement, FlgM un facteur antisigma sera sécrété via le corps basal pour permettre la transcription des gènes de type IV qui code pour d'autres flagellines et des composantes du moteur ^{29,52,75}.

1.1.4.4. Porines

Les porines OmpU et OmpT peuvent également être identifiées comme des facteurs de virulence. Ces porines font partie de la famille des *outer membrane proteins* (OMP) ⁷⁶. La production d'OmpU permet une augmentation de la résistance de *V. cholerae* à la bile, mais aussi dans la résistance de la bactérie à l'acide via son implication dans l'ATR ⁷⁶. OmpT, quant à elle, serait inversement régulé par rapport à la virulence puisque chez les mutants déficients pour le gène *ompT*, une diminution des niveaux de TC et TCP est observée. Ainsi, la régulation de ces porines est pleinement impliquée dans la virulence de *V. cholerae* ^{50,76}.

1.1.4.5. Mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens recouvrent les molécules synthétiques ou naturelles qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique avéré. *V. cholerae*, comme de nombreuses bactéries pathogènes a acquis au cours du temps des mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens via notamment le transfert horizontal de de gènes. Que ce soit pour la résistance aux antibiotiques ou aux PAM, différentes études ont montré le rôle de ces mécanismes dans la virulence de *V. cholerae* ⁷⁷. En effet, ces mécanismes de résistance permettent à la bactérie de contourner les défenses de l'hôte et ainsi accroître sa virulence ⁷⁷.

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par *V. cholerae* sont divers : pompe d'efflux, mutations spontanées, échange de plasmides entre souches ou avec d'autres espèces bactériennes ⁷⁸.

Concernant les mécanismes de résistance aux PAM ils sont nombreux comme l'altération de la charge membranaire, les mécanismes d'efflux, ou le clivage protéolytique ⁷⁹. Ces mécanismes seront plus précisément décrits en section 3.2.

1.1.4.6. Régulation des facteurs de virulence

Régulation génique

Chez les souches *V. cholerae* (cf section 1.1.2) exprimant la TC et le TCP, l'expression de ces facteurs est soumise à une régulation fine. En effet, ces facteurs ne seront exprimés que lorsque la bactérie atteint sa niche: l'épithélium intestinal (**Figure 2**) ^{42,80}.

Pour ce faire, *ctx* et *tcp* sont soumis au contrôle transcriptionnel de l'activateur majeur de virulence, ToxT. Le gène *toxT* est lui-même l'objet du contrôle transcriptomique des protéines transmembranaires ToxR et TcpP. En effet, TcpP et ToxR, dont les domaines cytoplasmiques N-terminaux se lient à l'ADN, permettent en collaboration avec respectivement TcpH et ToxS, l'activation de ToxT une protéine de la famille AraC/XylS. Cette dernière se lie alors directement aux promoteurs de *tcpA-F* et *ctxAB*, dans une région appelée « *totbox* » de 13 pb (**Figure 4**) ^{49, 80}. En amont, TcpP et ToxR sont également sous le contrôle transcriptionnel des activateurs cytoplasmiques AphA et AphB (**Figure 4**) ^{49,56}. ToxR est aussi impliqué dans la régulation de l'expression des porines telles qu'OmpU et

OmpT. L'expression du gène *ompU* est activée en présence de ToxR alors que l'expression du gène *ompT* est réprimée par ToxR ⁷⁶. La régulation fine de l'expression de ces porines est indispensable pour une résistance à l'acidité et à la bile, mais également la colonisation de l'hôte ^{42,76}.

L'ensemble de cette régulation est dépendant de l'environnement. Alors que l'activité de ToxT est soumise à une inhibition en présence de bile, AphA et AphB sont dépendants de la densité cellulaire via la voie du *quorum sensing* (QS) (cf ci-bas section « *quorum sensing* », **figure 4**) ^{61,81}. Ces mécanismes permettent à *V. cholerae* d'exprimer ses facteurs de virulence uniquement lorsque l'environnement est favorable. Ensemble, cette voie de régulation permet de protéger la bactérie des défenses de l'hôte, mais également une colonisation efficace ⁴².

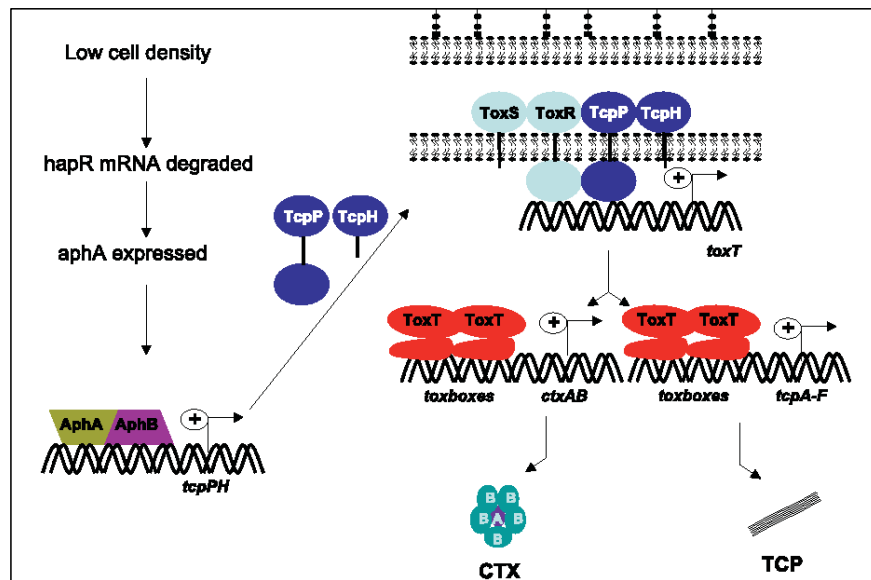


Figure 4: Régulation de l'expression de la TC et du TCP- A faible densité génique, les activateurs cytoplasmiques AphA et AphB s'expriment et activent l'expression de l'opéron *tcpPH* (représenté par le « + » sur la figure). En partenariat avec respectivement TcpH et ToxS, les protéines transmembranaires TcpP et ToxR se lient au promoteur de *toxT* et entraînent son expression. A son tour, ToxT se lie aux promoteurs de *ctxAB* et *tcpA-F* sur les régions « totbox » et permettent l'expression des facteurs de virulence: la TC et le TCP. De Matson *et al* (2007). Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par l'ASM

Le quorum sensing

Comme nous venons de le voir, certaines voies de régulation sont soumises à la densité cellulaire. Le QS représente la capacité des bactéries à communiquer entre elles⁸². En effet, la bactérie produit de petites molécules appelées auto-inducteurs qui s'accumulent dans l'environnement en fonction de la densité cellulaire. C'est la concentration de ces molécules qui module le transcriptome de la bactérie. Le QS permet de réguler de nombreux processus bactériens chez l'hôte ou dans son environnement, comme la formation de biofilms, la mobilité ou encore la virulence^{82,83}. Ainsi, lorsque *V. cholerae* commence à coloniser l'intestin grêle, peu de bactéries sont attachées à l'épithélium et la densité cellulaire est faible⁴². Dans ces conditions, le régulateur majeur du QS, HapR n'est pas produit (**Figure 5**). En effet, les concentrations en auto-inducteurs, CA-I et AI-2 détectées par CqsS et LuxQ sont faibles dans l'environnement^{61,84}. L'activité des kinases CqsS et LuxQ qui les produisent respectivement en intracellulaire est forte. Une voie de phosphorylation active alors la voie de réponse LuxO. LuxO permet alors la transcription de petits ARNr Qrr1-4 (**Figure 5**). Ces petits ARN inhibent la transcription de *hapR* tout en induisant la transcription de *aphA* et donc l'activation de l'expression des facteurs de virulence : TC et TCP⁸⁵. A haute densité cellulaire, le niveau des auto-inducteurs est fort, ce qui diminue l'activité kinase. La voie d'activation LuxO et donc la synthèse des ARNr est alors réprimée, ce qui permet l'activation de l'expression de *hapR* et donc l'arrêt de l'expression de *aphA* (**Figure 5**)⁸⁶. L'ensemble de ces mécanismes permet la régulation des facteurs de virulence via le QS par la densité cellulaire⁸⁴.

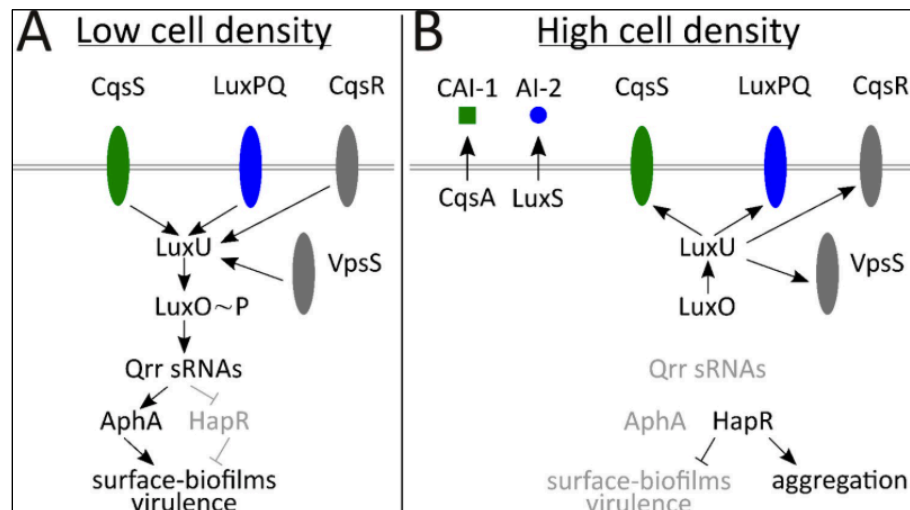


Figure 5: Voie de régulation du Quorum sensing (QS) – Lorsque la densité cellulaire est faible (A), la concentration en inducteur est très faible. L'activité des kinases LuxPQ, CqsR, CqsR et VpsS est importante et activent la voie LuxO. LuxO phosphorylé active alors la transcription des petits sARN Qrr qui induisent la transcription de AphA et bloque l'expression de HapR. A haute densité (B), le niveau des auto-induceurs (CAI-1; AI-2) est fort, la voie LuxO est alors bloquée, ce qui lève l'inhibition de HapR. De Jemielita et al (2018). *Droits intégraux de reproduction Creative Commons*

1.2. Mécanismes de défenses de l'hôte

En cas d'infection, l'hôte possède différents systèmes qui servent de barrières pour sa protection. Trois barrières peuvent être distinguées : les mécanismes physiques et chimiques non spécifiques, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

1.2.1. Mécanismes physiques et chimiques non spécifiques

Chez l'hôte sain, de nombreux éléments, comme l'acidité stomacale, la bile, le péristaltisme ou encore l'épithélium et le mucus intestinal permettent de limiter la colonisation par des pathogènes⁸⁷.

Acidité stomacale

Dans l'estomac, le pH est aux alentours de 4. Un des principaux rôles de cette acidité, outre la digestion des aliments est la prévention de colonisation de l'intestin par des pathogènes. En effet, le contenu gastrique composé d'ions HCl et de pepsine permet de tuer les bactéries en moins de 15 minutes. L'acide chloridique est sécrété par les cellules pariétales de l'estomac. *V. cholerae* est une espèce spécifiquement sensible à l'acidité. Dans le cadre d'une infection à *V. cholerae*, il a été montré que lorsque le pH stomacal est tamponné via l'utilisation de bicarbonate de soude ou du bol alimentaire, la dose minimale nécessaire pour la colonisation de l'hôte par *V. cholerae* est abaissée. Ainsi si la dose ingérée est trop faible, l'acidité stomacale permet de contrôler l'infection à *V. cholerae*^{87,88,89}.

La bile

La bile est une sécrétion hépatique présente dans le duodénum et composée de 95% d'eau dans laquelle sont dissous des sels biliaires, la bilirubine, du cholestérol, des acides aminés, des enzymes, etc⁴⁷. La bile a de nombreuses fonctions, comme la digestion des lipides, mais aussi la protection face aux pathogènes. En effet, elle contient des immunoglobulines A (IgA), des cytokines inflammatoires et permet la stimulation du système immunitaire dans l'intestin⁹⁰. De plus, la bile inhibe la croissance bactérienne. En effet, les acides biliaires sont notamment des molécules amphipatiques dont l'activité détergente endommage les membranes bactériennes⁴⁷.

Péristaltisme, épithélium et mucus intestinal

L'épithélium intestinal constitue également un rempart face à la colonisation par des pathogènes. Tout en tolérant la présence des micro-organismes du microbiote, il permet la protection de l'organisme face à de potentiels pathogènes. Il est composé d'une unique couche de cellules et sa surface apparaît comme hautement repliée avec des cryptes et des villosités ⁹¹. Cette structure particulière offre une surface particulièrement large pour l'absorption. Différents types cellulaires sont observés dans l'épithélium intestinal ⁹². La majorité de ces cellules sont des entérocytes qui sont responsables de l'absorption de l'eau et des nutriments. D'autres cellules, sont retrouvées telles que les cellules caliciformes, qui sont responsables de la production de mucus et notamment de la protéine glycosylée Muc2 ⁹¹. Cette protéine serait indispensable pour la protection de l'hôte face aux pathogènes. En effet, la présence de mucines à la surface de l'épithélium constitue un obstacle à la colonisation de *V. cholerae* (cf section 1.3.2). De plus, des souris déficientes dans l'expression de Muc2 sont incapables de contrôler une infection à *Escherichia coli* (*E. coli*) enteropathogénique ⁹³. Des cellules entero-endocrine et des cellules de Paneth qui sécrètent respectivement des hormones et des PAM sont également présentes au sein de l'épithélium intestinal ⁹².

Ces cellules présentent un renouvellement élevé. Les cellules souches intestinales sont présentes à la base des cryptes et un renouvellement est observé tous les 5 et 7 jours, celui-ci est accéléré en cas d'infection sous l'influence de cytokines telles que l'IL-13 ⁹⁴.

L'épithélium intestinal est entouré par des muscles lisses qui permettent le mouvement du bol alimentaire le long du tractus digestif. Ce mouvement est appelé péristaltisme et en cas d'infection le rythme de ces mouvements peut être augmenté pour permettre l'expulsion du pathogène ¹⁷.

Le corps humain abrite une population dynamique et complexe de micro-organismes appelée : microbiote. Le microbiote est majoritairement composé de procaryotes (bactéries et archées) mais aussi d'eucaryotes comme des levures et également certains virus (phages)⁹⁵. Le microbiote humain est divisé en différents écosystèmes en fonction de leur localisation : microbiote vaginal, microbiote intestinal, microbiote de la peau, etc⁹⁵. Les composants de ces éco-systèmes sont adaptés et spécifiques à chaque localisation et colonisent les lieux dès la naissance. Par exemple, dans l'intestin on retrouve plusieurs milliers d'espèces différentes dont majoritairement *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Enterobacteria spp.* En cas de pathologies la composition du microbiote sera modifiée⁹⁶. De nombreuses études décrivent les bénéfices qu'offrent le microbiote intestinal de l'hôte. En effet, ce dernier permettrait de métaboliser certains composants du bol alimentaire, favoriserait le développement du tissu intestinal ou encore contrôlerait la colonisation de différents pathogènes dans le système digestif⁹⁷. Chez des souris privées de microbiote dites « *germ-free* », la durée de l'infection via *Citrobacter rodentium* est allongée à 42 jours contre 10 jours chez des souris pourvues de microbiote alors que le recrutement des cellules immunitaires est identique⁹⁸. De plus, d'autres études montrent que l'utilisation prolongée d'antibiotiques et donc l'altération du microbiote conduit à une augmentation des infections par des entéro-pathogènes⁹⁹. Tout cela montre le rôle du microbiote comme barrière de protection face à la colonisation des pathogènes. Différents mécanismes expliqueraient cette protection. Dans le cadre de *V. cholerae*, certaines études montrent que la composition du microbiote serait un facteur de prédisposition pour la colonisation ce pathogène. Des travaux montrent notamment l'importance de *Bacteroides vulgatus* dans la protection face à l'infection par *V. cholerae* chez la souris. Cependant, peu d'études sont disponibles sur

l'effet spécifique du microbiote sur *V. cholerae*⁹⁴. Nous décrirons donc ici les mécanismes généraux de protection des bactéries commensales face aux pathogènes :

- (i) Un accès limité à l'épithélium intestinal permettrait de diminuer le pouvoir colonisateur des bactéries pathogènes. Ainsi, le premier mécanisme via lequel le microbiote offre une protection à son hôte est par compétition. La concurrence a lieu face à l'espace, mais aussi face aux nutriments disponibles à la surface de l'épithélium intestinal¹⁰¹. Par exemple, *E. coli* de type commensal compétitionne avec le type entérohémorragique via la consommation de certains acides aminés ou certains acides organiques¹⁰². Autre exemple, la sécrétion de facteurs de virulence par des pathogènes comme *Shigella flexneri* nécessite la présence dans l'environnement de certains composés en oxygène. Or, certaines bactéries anaérobiques facultatives consommeraient ces composés limitant alors la virulence du pathogène¹⁰³.
- (ii) D'autres mécanismes sont indirects et consistent en une modulation du système immunitaire innée, et des cellules de l'épithélium intestinal. En effet, les souris « *germ-free* », présentent des défauts dans le renouvellement de l'épithélium intestinal, mais aussi dans la production de PAM par les cellules de Paneth^{104,105}.
- (iii) Un autre mécanisme d'inhibition a lieu *via* la production par certaines bactéries de composés particuliers, certains de ces composés auront un effet direct sur les pathogènes. A partir de certains carbohydrates présents dans

l'alimentation, les bactéries du microbiote produiront des acides lipidiques à courte chaîne de type : acétate, propionate et butyrate. La présence d'acétate induit de la part des cellules épithéliales une réponse anti-inflammatoire et anti-apoptotique ¹⁰⁶. Il a par exemple, été montré qu'en absence de *B. vulgatis*, la présence de ces acides lipidiques à courte chaîne est diminuée, permettant la croissance de *V. cholerae*¹⁰⁰. De plus, dans certains cas, la présence de ces composés conduit à l'acidification du milieu et limite la colonisation par *E. coli* pathogène ¹⁰⁷. Ces acides lipidiques à chaîne courte peuvent également inhiber l'expression de facteurs de virulence comme le système de sécrétion de type III chez *Salmonella enterica* Seroovar Enteritidis et Typhimurium ^{107,108}. Dans d'autres cas, certaines bactéries du microbiote peuvent produire des composés pouvant conduire à une résistance de l'hôte. Par exemple, dans le cadre de l'infection à *V. cholerae*, la bactérie commensale *Ruminococcus obeum* produit un signal du QS AI-2, ce qui modifie l'expression de la TC (cf. section 1.5.6) et ainsi limite la capacité de colonisation de la bactérie ¹⁰⁹. Les bactéries du microbiote ont également la capacité de produire des peptides antimicrobiens. Cette habilité est ubiquitaire dans le règne bactérien, probablement *via* la dissémination de cette caractéristique par les éléments génétiques mobiles ^{107,110}. Les PAM d'origine bactérienne sont aussi connus sous le nom de bactériocines. Chez les bactéries à Gram négatif, les bactériocines sont classifiées en fonction de leur taille : les microcines et les colicines. Les microcines sont divisées en classe I et classe II ¹¹¹. Les microcines de classe I (par exemple les microcines C7 ou J25) sont relativement petites et sont caractérisées par la présence de nombreuses modifications post-traductionnelles. *A contrario*, les microcines

de classe II sont plus grandes et ne présentent pas de modifications post-traductionnelles^{93, 112}. Chez les bactéries à Gram positif, les bactériocines sont également divisées en deux classes : les lantibiotiques et les non-lantibiotiques^{113,114}. Les lantibiotiques sont de petits PAM entre 19 et 38 acides aminés contenant des modifications post-traductionnelles. Les non lantibiotiques sont plus larges, entre 25 et 60 acides aminés, thermostables et cationiques¹¹⁵.

Ainsi le microbiote régule *via* différents mécanismes et notamment la présence de PAM, la niche écologique. Ce système permet de lutter contre la colonisation par des pathogènes chez l'hôte¹¹⁶. Ce mécanisme agit en synergie avec d'autres mécanismes de l'hôte, comme la sécrétion de bile ou le peristaltisme pour empêcher l'invasion par des espèces néfastes comme *V. cholerae*.

Nous verrons en section 3, les différents mécanismes *via* lesquels les PAM bactériens exercent leur effet bactéricide. Ensemble, ces mécanismes permettent au microbiote d'agir véritablement comme un protecteur face aux pathogènes.

Le microbiote, ainsi que des éléments propres à l'hôte comme l'acidité stomacale, le péristaltisme ou encore l'organisation de l'épithélium intestinal sont autant d'éléments qui limitent la colonisation par des pathogènes. Lorsque les bactéries pathogènes arrivent à passer ces différentes barrières, l'hôte dispose de son système immunitaire, scindé en système inné ou adaptatif¹¹⁷.

1.2.2. Immunité innée

Quand l'agent pathogène colonise l'hôte, la première réponse de celui-ci est la mise en marche des mécanismes de l'immunité innée. L'immunité innée représente les défenses dont dispose l'hôte qui ne sont pas spécifiques à un pathogène en particulier ¹¹⁷.

Dans ce système, de nombreuses cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques participent ^{118, 119}. Les cellules hématopoïétiques sont plus spécifiquement des macrophages, des cellules dendritiques, des mastocytes, des neutrophiles, des éosinophiles et des cellules Natural Killer (NK). En parallèle aux défenses cellulaires, l'immunité innée comprend également une composante humorale qui inclut différentes protéines comme le complément, la protéine de liaison au LPS (LBP) et des PAM ¹²⁰.

De récentes études ont montré l'implication du système immunitaire inné dans la lutte contre l'infection à *V. cholerae* ⁸⁷. Il a été observé chez des patients atteints de forme sévère de choléra une augmentation des principaux médiateurs de l'immunité innée tels que la lactoferrine dans le sang ¹²¹. De plus, alors que des observations de biopsies de patients infectés avec *V. cholerae* ne montrent aucun changement morphologique au niveau de la muqueuse intestinale, des signes de réponses immunitaires innées comme la présence d'infiltrations de neutrophiles, la dégranulation des mastocytes et des éosinophiles, l'expression de molécules pro-inflammatoires comme le TNF- α ou d'interleukines sont observés ^{122, 123}. Tout ceci est confirmé à l'échelle transcriptomique par des études faisant part dans la muqueuse de sept patients cholériques de la prédominance des gènes de l'immunité innée dans les gènes surexprimés lors de l'infection ¹²¹, confirmant le rôle crucial des composants de l'immunité innée dans la défense de l'hôte face à *V. cholerae*.

L'intrusion de *V. cholerae* chez l'hôte serait reconnue par les cellules effectrices du système immunitaire inné. Dans le cadre de ce système, ce sont des motifs très conservés dans le règne microbien dits *Pattern recognition receptors* (PRR) qui induisent une réponse. Par exemple, les récepteurs de la famille *Toll-like* reconnaissent des épitopes retrouvés dans tout le règne microbien. Concernant *V. cholerae*, ce sont le LPS, le flagelle et le polysaccharide O spécifique (impliqué dans le sérotype) qui permettent majoritairement d'initier la réponse du système inné ^{11,124}. En réponse à cela, différentes voies métaboliques seraient impliquées, comme l'activation de la voie NF-κB, l'inflammasome NLRP3 ou encore la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) ^{125,126}. Les mécanismes qui en découlent comprennent la phagocytose, la cytotoxicité, mais aussi la sécrétion de facteurs dont les PAM, des cytokines ou encore des protéases ^{126, 127}.

Les PAM humains, les défensines et les cathélicidines, sont exprimés par une variété de cellules du système immunitaire inné comme par exemple les cellules NK, mais aussi par des cellules épithéliales ¹²⁸. L'expression des PAM par les cellules peut être induite par différents stimuli comme un état pro-inflammatoire ou la présence de cytokines (TNF, IL-1, ...) mais il arrive aussi que leur production soit constitutive comme, par exemple l'expression de défensines par les neutrophiles. Leur mode d'action sera décrit en section 3.

Des études ont précédemment montré que suite à une infection à *V. cholerae*, la réponse immune innée se caractérise par une augmentation de l'expression des PAM au niveau du duodénum. En effet, il a été observé une augmentation de la transcription des défensines et de la cathélicidines LL-37 chez des patients infectés avec *V. cholerae* O1 ¹²⁹.

Les défensines

Les défensines sont de petits PAM cationiques caractérisées par la présence de trois sous-unités reliées par des ponts disulfures divisés en défensines α ou β ¹³⁰. Les défensines α sont produites par les neutrophiles, les macrophages et les cellules de Paneth dans l'intestin, alors que les défensines β sont produites par de nombreux leucocytes et cellules épithéliales. Leur production est soumise à une régulation fine qui serait cellule spécifique ¹³¹. Par exemple, dans les cellules de Paneth, suite à une stimulation par le LPS, les défensines actives sont produites suite à un clivage de la molécule précurseur par le trypsinogène. Les défensines ciblent un large spectre de micro-organismes dont des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif et via leur charge positive, ces PAM établiront un premier contact par liaisons hydrophobes à la membrane des bactéries chargées négativement ^{131, 132, 133}.

Les cathélicidines

Les cathélicidines sont des petits PAM cationiques retrouvées chez de nombreux mammifères (humains, bovins, équidés, souris ...). Les cathélicidines sont caractérisées par un domaine cathéline, N-terminal conservé et un domaine C-terminal antimicrobien. Chez l'humain, la seule cathelicidine est LL-37. Ce PAM est exprimé majoritairement par les neutrophiles et les cellules épithéliales au cours de l'inflammation. Un précurseur de LL-37 est retrouvé dans les granules des neutrophiles. Après l'activation de ces derniers, le précurseur est clivé par la protéinase 3, libérant le domaine C-terminal qui est ensuite sécrété dans le compartiment extracellulaire. Dans le milieu extracellulaire, LL-37, via sa structure

hélicoïdale, s'associe à la surface des membranes bactériennes pour avoir son effet bactéricide et former des pores dans la membrane bactérienne ¹³⁴ (cf section 3). De plus, LL-37 aurait un rôle immuno-modulateur. En effet, de nombreuses études ont montré que ce PAM aurait un effet chimioattracteur sur les cellules immunitaires circulantes telles que les neutrophiles, les monocytes ou encore les cellules T ¹³⁵. De plus, LL-37 activerait la production et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires ^{134,136}. Ainsi, via le recrutement de cellules effectrices, mais aussi de composés comme les PAM, l'hôte peut se défendre face aux infections en attendant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative spécifique au pathogène.

1.2.3. Immunité adaptative

L'immunité adaptative est spécifique d'un pathogène et consiste d'une part en la sécrétion d'anticorps spécifiques à l'antigène et d'autre part en l'activation par les cellules dendritiques des lymphocytes T qui détruiront les cellules infectées ou stimuleront la production d'anticorps par la sécrétion de cytokines. L'activation d'une réponse immunitaire provoque des mécanismes mémoires qui permettront une réponse plus rapide en cas de réinfection par le même pathogène ^{117,137}.

Une protection suite à une infection naturelle a été reportée suite à une infection à *V. cholerae* ¹³⁸. Cependant, les mécanismes de l'immunité adaptative dans ce cas n'ont été que peu étudiés. Les patients cholériques développent une réponse mémoire à cellules B envers au moins les antigènes protéiques de la TC mais aussi du TCP ¹³⁹.

En cas de rupture de ces barrières, l'infection survient. Dans le cas de *V. cholerae*, certains antibiotiques sont prescrits comme l'érythromycine, la tétracycline ou la doxycycline pour limiter la durée de l'infection, réduire les symptômes et les diarrhées ¹⁴⁰, ¹⁴¹. Malheureusement, suite à l'utilisation excessive de ces composés, *V. cholerae*, comme de nombreux pathogènes, présente de plus en plus de mécanismes de résistances aux antibiotiques ¹⁴². Les PAM ont montré une large importance dans la modulation de l'immunité innée, mais aussi un effet bactéricide face aux pathogènes. De plus, certains PAM sont déjà commercialisés, ils apparaissent comme une excellente alternative aux antibiotiques. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des PAM et des réponses des pathogènes envers ces agents pourrait permettre de mettre à jour de nouveaux traitements.

1.3. Peptides antimicrobiens

La production de PAM est un mécanisme de défense utilisé par les bactéries et les mammifères, mais plus largement dans tout le règne du vivant ¹⁴³. A ce jour, près de 2800 PAM différents sont répertoriés. Alors que les PAM d'origine bactérienne permettent de réguler la communauté microbienne et d'empêcher la colonisation par des bactéries étrangères, les PAM d'origine humaine seraient les molécules effectrices du système immunitaire inné via leur effet antimicrobien et immunomodulateur ^{144,145}.

Les PAM sont pour la plupart cationiques et amphiphiles et vont différer quant à leur origine (cf. section 2 pour les PAM d'origine bactérienne ou humaine), leur efficacité, leur cible (bactéries à Gram positif ou à Gram négatif), mais aussi via leur mode d'action ¹⁴⁶.

1.3.1. Mode d'action des PAM

1.3.1.1. Perméabilisation de la membrane

Un mécanisme courant dans la toxicité des PAM face aux bactéries est la perméabilisation de la membrane bactérienne. De nombreux PAM sont chargés positivement, ce qui permet l'attraction vers la membrane externe pour les bactéries Gram négatif ou la paroi bactérienne pour les bactéries Gram positif qui sont chargées négativement ¹⁴⁷. Les PAM s'accumulent alors à la surface bactérienne pour former des pores et induire la lyse cellulaire. Différentes théories expliqueraient la formation de ces structures : (i) à haute concentration, les peptides s'insèrent perpendiculairement dans la membrane et forment des pores ; (ii) les peptides s'insèrent parallèlement et à haute concentration les PAM agissent comme un détergent ; ou (iii) les peptides s'insèrent perpendiculairement à la membrane et à haute concentration ils induisent une déformation de la membrane et donc la formation de dommages ^{148,149,150,151}. Les pores induisent alors une fuite d'ions et donc des chocs osmotiques qui mènent à la lyse bactérienne ^{152,153}.

De tels mécanismes sont par exemple observés avec la Polymyxine B (PmB). La PmB, très utilisée dans le traitement d'infection avec des bactéries Gram négatif, est un PAM cationique qui s'associe avec le lipide A du LPS et entraîne alors la formation de pores à la membrane bactérienne ^{152, 154, 155}.

1.3.1.2. Mécanismes à la membrane

Un autre mécanisme responsable de l'effet bactéricide des PAM est l'inhibition de processus à la surface bactérienne. En effet, différentes études suggèrent que les PAM ne sont pas répartis uniformément à la surface de la bactérie. Que ce soit au niveau de la paroi bactérienne (bactéries Gram positif) ou au niveau de la membrane bactérienne, certains PAM peuvent s'associer préférentiellement à des sites impliqués dans la division, la différenciation cellulaire ou la sécrétion, inhibant ainsi ces processus et provoquant la lyse bactérienne. Par exemple, la PmB s'associe préférentiellement chez *Streptococcus pyogenes* à des microdomaines lipidiques anioniques responsables de la sécrétion de protéines associés à la virulence, engendrant l'inhibition de la sécrétion de certaines toxines^{156,157}.

1.3.1.3. Inhibition des mécanismes cytosoliques

Les PAM peuvent agir à différents niveaux en intracellulaire pour conduire à la lyse bactérienne (bactéricide) ou à l'inhibition de la croissance bactérienne bactériostatique (**Figure 6**).

En effet, certains PAM pourraient cibler des molécules cytosoliques et ainsi inhiber des processus comme la synthèse de l'ADN, la synthèse de la paroi membranaire, la synthèse de protéines, etc. La figure 6 répertorie les différents mécanismes cytoplasmiques qui font l'objet d'une inhibition par des PAM¹⁵⁸.

Par exemple, la microcine J25 produite par *E. coli* pénètre les bactéries à Gram négatif via les transporteurs à sidérophores. Au cytoplasme, la microcine J25 se lie à l'ARN polymérase, inhibant la transcription. Un tel mécanisme empêche alors la croissance

bactérienne.^{159, 160} Autre exemple, la mersacidine cible la synthèse de la paroi pour leur effet bactéricide. En effet, Brotz et al., ont démontré que ce PAM inhibe la biosynthèse du polyglycane en interférant dans la réaction de transglycolysation¹⁶¹.

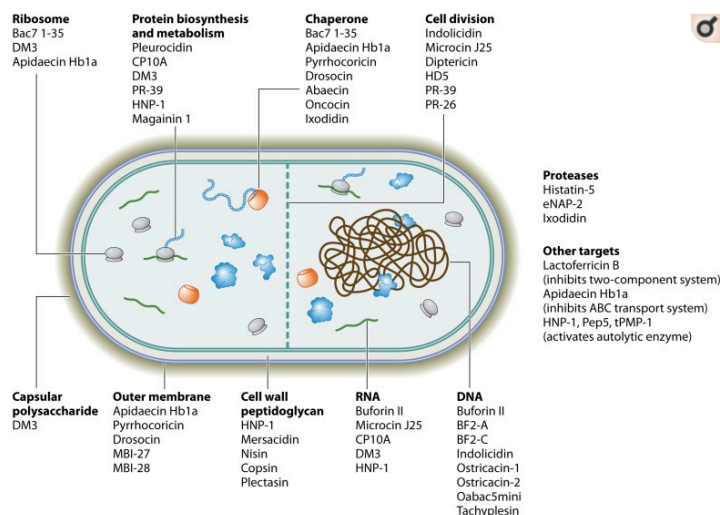


Figure 6: Les mécanismes cytoplasmiques, cibles de peptides anti-microbiens chez les bactéries. Le ribosome, la division cellulaire la synthèse des polysaccharides, de la membrane externe, des protéines ou du peptidoglycane, l'ADN, l'ARN ou encore des mécanismes de protections assurés par les chaperonnes ou des protéases sont la cible de certains peptides antimicrobiens (PAM). De Le et al (2017). *Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par l'ASM*

1.3.1.4. Immunomodulation des PAM

Enfin, certains PAM agissent en modulant le système immunitaire de l'hôte. En effet, il a été montré que de nombreux PAM ont un effet chemo-attracteur sur les cellules du système immunitaire innée et adaptatif. Plus particulièrement, il a été montré qu'un PAM tel que LL-37 attire les neutrophiles, monocytes, cellules T et mastocytes mais aussi module la réponse génique de nombreuses cellules comme les monocytes via activation de p38, des voies de signalisation ERK ou encore la voie NF- κ B¹⁶². Des études ont également rapporté

que des PAM initialement produits par des organismes marins et injectées chez la souris avaient également un effet immuno-modulateur comme la clavanine A qui entraîne une modulation de la production de cytokines chez la souris¹⁶³.

Ainsi les PAM agissent à différents niveaux sur le métabolisme bactérien ou via modulation du système immunitaire. Ceci provoque une pression de sélection sur les bactéries, qui ont alors développé des mécanismes de résistance.

1.3.2. Mécanismes de résistance aux PAM chez les bactéries à Gram-négatif

V. cholerae, comme de nombreuses autres bactéries, a développé des mécanismes de résistance aux PAM : modification de la charge membranaire, pompe d'efflux pour l'export des PAM, production de vésicules pour la dilution des PAM, les systèmes de réponse au stress^{78, 164}.

1.3.2.1. Systèmes de réponse au stress

La bactérie dispose de senseurs qui lui permettent de s'adapter à des conditions environnementales drastiques telles que la présence de PAM. Ces systèmes permettent l'expression de gènes de réponse au stress, tout ceci sous contrôle du facteur sigma E. En absence de signaux de stress, RseA, le facteur anti-sigma E, bloque sigma E à la face cytoplasmique de la membrane interne. Les PAM endommagent la membrane et provoquent des changements conformationnels des protéines de la membrane externe, OmpC et OmpU.

Ces changements exposent un domaine particulier riche en tyrosine et phénylalanine qui se lie alors au domaine de la protéase DegS et permet son activation. La forme activée de DegS clive RseA, ce qui permet la libération à terme du facteur sigma E qui permettra l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes de réponse au stress et *in fine* à la protection de *V. cholerae*^{165, 166, 167}.

1.3.2.2. Modification de la charge membranaire

La structure cationique des PAM leur permet de former des interactions électrostatiques avec la surface bactérienne¹⁶⁸. Différents mécanismes de résistance aux PAM reposent donc sur la modification de la charge membranaire. Chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, par exemple, la modification de la charge provient de l'aminocétylation du phosphatidyl-glycérol avec de la L-lysine ou de la L-alanine¹⁶⁹.

Chez *V. cholerae* O1 El Tor, il a été montré que ce sont les gènes organisés en opéron (*almEFG*) codant pour les enzymes AlmE (*Vc1579*), AlmF (*Vc1578*) et AlmG (*Vc1577*) qui sont responsables de la modification du lipide A du LPS et *in fine* de la modification de la charge membranaire¹⁷⁰. En effet, on a observé en séquençage d'ARN une augmentation de l'expression de l'opéron *almEFG* chez *V. cholerae* après infection chez la souris¹⁷¹.

AlmE génère du glycyl-AMP ainsi que du pyrophosphate à partir de glycine et d'ATP. Le glycyl-AMP est alors lié à une protéine de transport : l'holo-AlmF, issue du transfert du 4'-phosphopantéthéinyl du co-enzyme A sur l'apo-AlmF (**Figure 7**). Ce nouveau composé glycyl-AlmF est utilisé par AlmG pour estérifier la glycine du lipide A, ce qui lui confère une charge positive au lipide A et réduit la charge négative globale de la membrane de *V. cholerae* El Tor et donc les liaisons électrostatiques entre les PAM (en

particulier la PmB) et celle-ci (**Figure 7**). L'expression de l'opéron *almEFG* est modulée par le système à deux composantes VprA et VprB. Lorsque VprB, une protéine kinase située à la membrane est activée, elle s'auto-phosphoryle. Le groupement phosphate est alors transféré sur le régulateur de la réponse, VprA, qui active par liaison directe au promoteur l'expression de l'opéron *almEFG* ^{172,173}.

Chez les souches classiques, les mutants de *V. cholerae* délétés pour *almE*, *almF* ou *almG* sont 100 fois plus sensible à la PmB que la souche sauvage. De plus, la transformation d'une souche classique avec un plasmide codant pour l'opéron *almEFG* induit une augmentation importante de la résistance à la PmB ^{170, 173}.

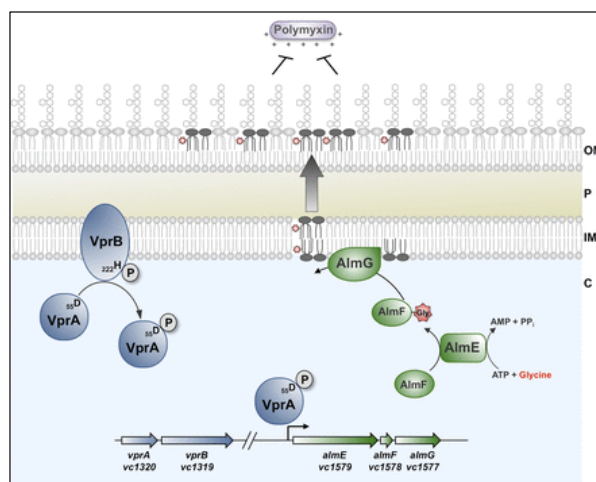


Figure 7 : Mécanisme de modification de la charge membranaire chez *V. cholerae* – Lorsque VprB (bleu) présente à la membrane interne (IM) est stimulée, elle s'auto-phosphoryle et le groupement phosphate est transféré sur VprA (bleu). VprA phosphorylée active l'expression de l'opéron *almEFG*. AlmE (vert) agit comme une ligase et permet la liaison d'une glycine (rouge) à la protéine AlmF. Le complexe AlmF-Gly sert de substrat à AlmG pour l'esterification de la glycine du lipide A. Il en résulte une augmentation de la charge nette de la membrane externe (OM) et donc une répulsion du PAM (ex: PmB) chargé négativement. De Herrera *et al.* (2015) Droits de reproduction accordés pour écriture de thèse ou manuscrit étudiants par l'ASM

1.3.2.3. Dilutions des PAM

Un autre mécanisme utilisé par *V. cholerae* est la dilution des PAM via leur liaison aux vésicules de sécrétion par exemple. En effet, les bactéries à Gram négatif relâchent des vésicules de 50 à 200 nm de diamètre dites vésicules de la membrane externe ou *outer membrane vesicles* (OMV). Ces vésicules à double membranes sont produites *via* des invaginations de la membrane externe. Par conséquent, elles contiennent de l'ADN, de l'ARN, des protéines de la membrane externe, du LPS, des phospholipides mais aussi des contenus périplasmiques. Leurs rôles sont divers, dont notamment la libération des facteurs de virulence à des sites distaux ou proximaux¹⁷⁴.

La protéine de matrice des biofilms Bap1 serait particulièrement importante dans ce mécanisme de résistance. En effet, en présence de concentrations sous létale en PmB, le contenu protéique à la surface des vésicules de sécrétion est modifié. En effet, dans ces conditions, une augmentation du niveau d'OmpT est observée à la surface des vésicules. Bap1, sécrétée par *V. cholerae*, se lie alors à OmpT via son domaine LDV (**Figure 8**). Suite à cela, si la bactérie est exposée à des concentrations fortes en LL-37, le PAM se lie à la vésicule de sécrétion via Bap1, qui agit comme un adaptateur. La concentration en PAM est abaissée. Ce mécanisme permet alors d'augmenter le seuil de résistance de *V. cholerae* aux PAM¹⁷⁵ (**Figure 8**).

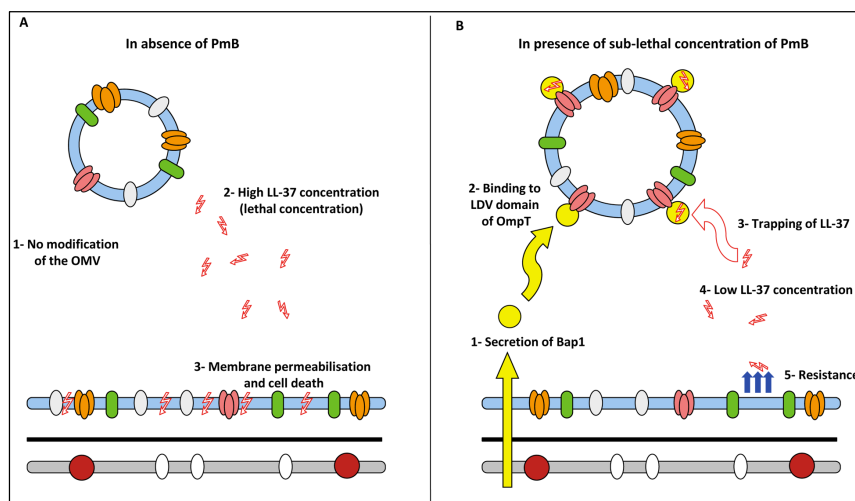


Figure 8 : Dilution des PAM via Bap1 à la surface des OMV– (A) En absence de PmB la quantité d’OmpT à la surface des OMV est faible, la concentration en PAM à l’environnement bactérien est forte. La membrane bactérienne est fortement affectée par l’effet bactéricide. (B) En présence de concentrations sous létales de PmB, la quantité de la porine OmpT à la surface des OMV est forte. Bap1 est sécrétée par *V. cholerae* et se lie à OmpT via le domaine LDV. Par la suite, lorsque la bactérie est exposée à une concentration forte en LL-37. Le PAM est piégée à la surface des vésicules de sécrétion et sa concentration à la membrane bactérienne est abaissée. Duperthuy *et al.* (2013). *Droits intégraux de reproduction Creative Commons*

1.3.2.4. Digestion des PAM

Certains mécanismes de résistance aux PAM sont liés à la dégradation des PAM par la bactérie avec par exemple la sécrétion de protéase. Chez *V. cholerae*, une hypothèse repose notamment sur l’activité de PrtV. Cette protéase est extracellulaire et appartient à la famille des M6 métallo-protéases¹⁷⁶. Cette protéase est associée aux OMV et plus sa concentration est élevée, plus la résistance de la bactérie est importante face à des PAM comme LL-37. Ainsi, PrtV possède un domaine protéolytique M6 peptidase qui pourrait permettre la protéolyse de LL-37 avant que celui-ci n’endommage la bactérie³⁶.

1.3.2.5. Formation de biofilms

Un autre mécanisme utilisé par les bactéries pour se protéger des agents antimicrobiens est la formation de biofilms (cf section 1.1.3.1). En effet, sous cet état les bactéries présentent une meilleure résistance face aux antibiotiques mais aussi aux PAM. Cet effet s'expliquerait par la difficulté de pénétration des PAM de la matrice extracellulaire des biofilms.

1.3.2.6. Capsule

Enfin chez certaines bactéries, la présence d'une capsule protège de l'attaque des PAM. Cette structure, observable en microscopie électronique est présente chez de nombreux pathogènes tels que *E. coli*, *S. aureus* mais aussi le sérotype O139 de *V. cholerae*. La capsule est composée de longues chaînes de polysaccharides de la capsule bactérienne (CPS) ¹⁷⁷. Il a notamment été montré que chez *Klebsiella pneumoniae* ou *Neisseria meningitidis*, l'implication des CPS dans la résistance aux PAM tels que la PmB. De plus, une corrélation entre le niveau d'expression des CPS et la résistance à la PmB a été observée chez *K. pneumoniae* ^{178,179}. Ces mécanismes seraient liés aux charges négatives portées par les CPS qui agiraient alors comme un piège pour les PAM chargés positivement ^{168, 179}.

Ainsi cette revue de littérature nous a permis de décrire le cycle de vie de *V. cholerae* et de mettre en avant les différents mécanismes d'adaptation qui lui permettent de survivre dans l'environnement aquatique et chez l'hôte. Durant la colonisation de l'hôte, *V. cholerae*

est confronté à différents éléments de protection, dont le microbiote et l'épithélium intestinal. Tous deux produisent de petits peptides appelés PAM qui agissent à différents niveaux de la bactérie pour permettre sa lyse ou l'inhibition de la croissance. Malheureusement, la bactérie a développé différents mécanismes de résistance aux PAM. Certains de ces mécanismes ont déjà été identifiés, mais les connaissances restent parcellaires, principalement parce que l'identification de ces mécanismes s'est bien souvent reposée sur des méthodes de mutagenèse aléatoire. Pourtant, les PAM pourraient constituer une excellente alternative aux antibiotiques.

Ainsi, il convient de proposer de nouvelles méthodes d'identification des mécanismes de résistance et de déterminer la nature de ceux-ci, afin d'utiliser comme il se doit les PAM pour traiter des affections comme le choléra.

1.4. Problématique et objectifs :

Lors de la transmission de *V. cholerae* par ingestion d'eau ou de nourriture contaminée, la bactérie colonise l'intestin grêle, provoquant alors via la sécrétion de TC d'abondantes diarrhées aqueuses. Face à cette agression, l'épithélium intestinal et les bactéries du microbiote agissent comme une barrière, en exprimant notamment des PAM. La résistance aux PAM représente un important facteur de virulence. Or, *V. cholerae*, comme de nombreux autres pathogènes présente des mécanismes de résistance aux PAM accrus par le biais de mécanismes comme la modification de la charge membranaire, l'utilisation de pompes à efflux ou encore la séquestration et la dégradation des PAM. Malgré une avancée constante de la compréhension des mécanismes de résistances bactériens aux PAM, de nombreuses inconnues demeurent en raison principalement des techniques de mutagenèse

aléatoire utilisées pour leur identification. Pourtant, une meilleure compréhension nous permettrait de développer de nouvelles thérapies antimicrobiennes, notamment en limitant l'activation des mécanismes de résistance aux PAM par les pathogènes.

Nous posons l'hypothèse que certaines protéines dont l'expression est modifiée en présence de PAM seraient impliquées dans la résistance aux PAM.

L'objectif général de cette étude est d'identifier et comprendre des mécanismes encore méconnus utilisés par *V. cholerae* pour résister à l'action des PAM.

Tout d'abord, à partir des expériences d'identification protéique qui ont été réalisés, nous avons identifié les protéines qui présentent des différences quantitatives en présence de PAM et donc qui pourraient être impliquées dans les mécanismes de résistance aux PAM.

Dans un second temps, l'effet de la délétion d'une des protéines candidates a été évalué. La souche délétée a été caractérisée. Pour ce faire, nous avons évalué la réponse de cette souche aux PAM via l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices et de la perméabilité membranaire.

Enfin, nous avons déterminé quels sont les effets de ces mécanismes de résistance sur la virulence de *V. cholerae*. En collaboration avec le Dr Eric Déziel (INRS), nous avons mis au point un suivi l'infection de *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) par *V. cholerae*.

2. Matériels et Méthodes :

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture :

La souche *V. cholerae* A1552 (O1, El Tor, Inaba) a été isolée chez un patient cholérique en 1992. Les souches A1552 sauvage et A1552 $\Delta ompV$ (dérivée de la souche sauvage *V. cholerae* O1, El Tor, Inaba) sont cultivées pour culture primaire en milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C, 120 rpm durant 16h puis diluées à 1/50 pour des cultures secondaires jusqu'à l'obtention de la densité optique (D.O) désirée. Ces D.O sont évaluées au spectrophotomètre à 600 nm. Dans certains cas, les bouillons de culture ont été supplémentés avec de la PmB (Polymixine B sulfate, Millipore, CAS#1405-20-5 lot : 1305RP30930) ou du LL-37 (LL-37, Novus Biological, NBP2-22738).

2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices :

A partir d'une culture de 16h en milieu LB, une dilution au 1/50 est faite avec du milieu *Poor Broth* (PB, 1% Bactotryptone, pH 7.5) sous agitation à 120 rpm puis cultivée jusqu'à l'obtention d'une densité optique D.O. $_{600nm}=0,3$. Ces cultures sont diluées et testées avec différentes concentrations de PAM. Après 16h, les D.O sont évaluées avec le lecteur de plaque Les concentrations minimales inhibitrices sont fixées à la concentration minimale de PAM avec laquelle la croissance bactérienne est détectée¹⁸⁰.

2.3. Isolement des vésicules de sécrétion :

Après une culture en milieu LB de 16h, 37°C, sous agitation, le surnageant de culture est récupéré via une centrifugation (15 minutes, 5000 x g, 4°C). Ces surnageants sont filtrés avec une membrane PVDF (0,22 µm, Milipore) puis centrifugés à 100 000 x g, 2h, 4°C dans un rotor 70 Ti (Beckman Instruments Inc). Le culot de vésicules est resuspendu dans du *phosphate buffered saline* (PBS). Un échantillon de solutions de vésicules de sécrétion à concentration équivalente à 200 fois la concentration physiologique est mis à migrer sur gel d'acrylamide 13%, 2h, 150 Volts. Le gel est fixé au méthanol, lavé durant la nuit et coloré au nitrate d'argent.

2.4. Préparation de bactéries dépourvues de vésicules

Après une culture en milieu LB de 16h, 37°C, sous agitation, le culot bactérien est récupéré via une centrifugation (15 minutes, 5000 x g, 4°C). Le culot est ensuite resuspendu en PBS à une concentration équivalente à la concentration physiologique.

2.5. Test de protection aux vésicules de sécrétion :

La concentration des vésicules de sécrétion est ajustée pour atteindre la concentration physiologique (1X) ou un dixième de la concentration physiologique (1/10X) Les vésicules ainsi préparées sont alors ajoutées à une culture bactérienne au préalable centrifugée (5000*g, 4°C, 15 minutes) et mises en contact avec une gamme de dilution de PmB ou de LL-37 pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices.

2.6. Cytométrie en flux :

Les cultures secondaires sont mises en culture en milieu LB jusqu'à l'obtention d'une D.O_{600nm} = 1. Après dilution au 1/500^{ème}, les cellules sont marquées à la fois au SYTO 9 (5 µm, Invitrogen, ex/em : 485 nm/598 nm) ainsi qu'à l'iodure de propidium (IP) (15 µg/ml) selon les conditions d'utilisation proposées par le fabricant. A l'intérieur de la population bactérienne (déterminée via les critères FSC et SSC), la population IP positive a été évaluée dans la population SYTO 9 positive. Le SYTO9 excité à 483 nm et qui émet à 503 nm est un intercalant des acides désoxyribonucléiques (ADN) qui permet de marquer les bactéries à Gram positif et Gram négatif mortes ou vivantes. L'iodure de propidium est un marqueur des acides nucléiques qui marque les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, l'excitation est à 538 nm alors que l'émission est à 617 nm.

2.7. Infection de *Drosophila melanogaster* :

A la suite de culture de 16h de *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage, des bouillons à des concentrations équivalentes aux concentrations physiologiques (1X) ou dix fois concentrées (10X) ou une solution de LB ont été déposées sur papier buvard et mis en présence de mâles *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). La survie a alors été observée durant 200 heures (une durée bien supérieure à une infection de *V. cholerae* chez *D. melanogaster*³⁶). Chaque groupe était composé de 10 mâles (le sexe des animaux ne changerait pas l'infection à *V. cholerae*³⁶).

3. Résultats :

3.1. Identification de protéines impliquées dans des mécanismes de résistance aux PAM chez *V. cholerae* O1 El Tor A1552

Dans un premier temps, nous souhaitons identifier les protéines dont l'expression était modifiée en présence de PAM. Ces protéines pourraient être impliquées dans des mécanismes de résistance. Pour ce faire, des expériences préliminaires ont été réalisées par Candice Cros (étudiante à la maîtrise)¹⁸¹. La souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 a été mise en culture en présence de différentes doses sous-létales de PAM d'origine bactérienne : Microcine C7, Lactocine 705, Thuricine S, Microcine J25 et PmB^{160,182, 183, 184}. On a choisi de se concentrer sur les PAM d'origine bactérienne pour se rapprocher des PAM produits par le microbiote. Les conditions de culture sont rapportées dans le tableau 1.

Conditions de culture	1	2	3	4	5	6
PAM utilisé	∅	Microcine C7	Lactocine 705	Thuricine S	Microcine J25	Polymixine B
Concentrations PAM (µM)		350	50	188	8,8	9

Tableau 1 : Conditions de culture pour l'identification de protéines d'intérêts. Lors d'une expérience préliminaire faite dans le laboratoire. La souche sauvage *V. cholerae* A1552 sauvage a été cultivée selon 6 conditions différentes (1 à 6 dans le tableau) en présence ou non de PAM à des concentrations sous-léthales.

Lorsque les cultures ont atteint $D.O_{600nm} = 2$ (D.O à laquelle *V. cholerae* se trouve en phase de croissance¹⁸⁵), elles ont été fractionnées (fraction cytoplasmique, membranaire et sécrétée), les protéines extraites, quantifiées et analysées en spectrométrie de masse par la plateforme en protéomique de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC). Les conditions 1, 2, 3, 4, 5 et 6 représentent respectivement les cultures en absence

de PAM, en présence de Microcine C7, de Lactocine 705, de Thuricine S, de Microcine J25 et de PmB. Aucune culture n'a montré de retard de croissance ou de diminution de densité optique.

Par la suite, nous avons procédé à l'analyse des résultats via le logiciel Scaffold. Ces résultats ont permis d'identifier les protéines qui étaient différemment exprimées entre les différentes conditions et cela au niveau des protéines cytoplasmiques, membranaires et sécrétées. Au niveau membranaire, nous avons identifié 670 protéines, 461 protéines au cytoplasme et enfin 604 protéines au niveau du surnageant bactérien (fraction de protéines sécrétées) dont l'expression est modifiée en présence de PAM.

Parmi les protéines sécrétées, nous avons observé la présence de la protéase Lap. Alors que cette protéase n'est pas présente dans la fraction sécrétée en l'absence de PAM, elle a été détectée dans toutes les conditions avec PAM et en quantité maximale en présence de PmB. De plus, nous avons présenté en section l'implication de PrtV dont les fonctions sont de l'ordre de Lap, dans des mécanismes de résistance Lap est une aminopeptidase de 46 kDa qui catalyse le clivage des peptides ou des protéines au niveau de l'extrémité N-terminale des leucines.. Lap est codée par le gène *VCA_0813*¹²⁶.

En parallèle, nous avons observé la présence d'OmpV dans la fraction sécrétée en présence de Microcine C7, de Lactocine 705, de Thuricine S et de PmB. De plus, OmpV a été observé dans la fraction membranaire, minoritairement en présence de PmB (**Figure 9**).

Outer membrane protein OmpV OS=Vibrio cholerae serotype O1 (strain ATCC 39315 / El Tor Inaba N16961) GN=ompV PE=1 SV=1

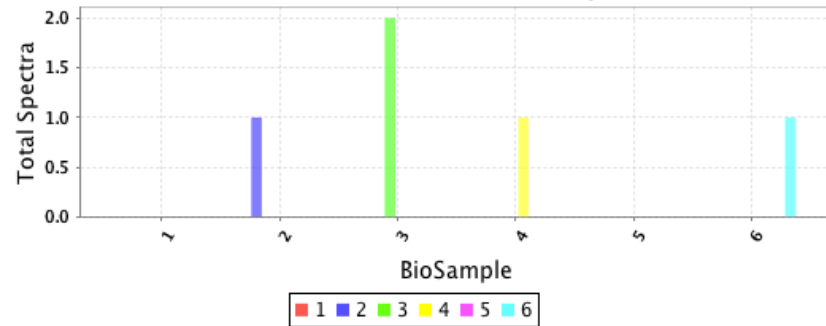


Figure 9 : Quantification de la porine OmpV dans la portion sécrétée chez *V. cholerae* en présence ou non de différents PAM– *V. cholerae* a été cultivée en différentes conditions (en abscisse), en milieu LB supplémenté ou non en peptides antimicrobiens (1: \emptyset ; 2 : Microcine C7; 3: Lactocine 705; 4: Thuricine S; 5: Microcine J25; 6: Polymixine B). Les protéines ont été quantifiées ici chaque barre représente la quantification relative (en ordonnée) de la porine OmpV dans chaque condition. Cette quantification relative a été obtenu après analyse avec le logiciel Scaffold.

Ces résultats sont en accords avec les observations qui avaient été faites par Duperthuy et *al.*¹⁷⁵ qui montraient une augmentation de la quantité d'OmpV présente au niveau des vésicules de sécrétion lorsque *V. cholerae* est exposée à des concentrations sous-létales en PmB¹⁷⁵. OmpV est une protéine de 28 kDa de la famille des protéines de la membrane externe (*outer membrane proteins*) qui sont intégrées à la membrane externe des bactéries¹⁸⁶. Comme décrit précédemment, OmpU, une protéine de la même famille est également impliquée dans les mécanismes de résistance à *V. cholerae*^{165,166}. OmpV est codée par le gène *ompV* qui serait organisé en opéron avec *vprA* et *vprB*, responsables de la modification de charge du LPS (cf section 3.2.2)¹⁷².

Les protéines **OmpV** et **Lap** sont apparues comme d'excellentes candidates pour participer à des mécanismes de résistance de *V. cholerae* aux PAM.

3.2. Caractérisation du mutant $\Delta ompV$

Le mutant $\Delta ompV$ était disponible au laboratoire. Ce mutant a été construit en utilisant la technique décrite par Vaitkevicius et al.³⁶. Dans un premier temps, nous avons souhaité caractériser ce mutant. Pour ce faire, nous avons i) évalué la croissance du mutant $\Delta ompV$ en présence ou non de PAM ; ii) déterminé les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides en PAM chez le mutant $\Delta ompV$ et enfin iii) caractérisé la perméabilité membranaire du mutant $\Delta ompV$ en présence ou non de PAM.

3.2.1. Caractérisation de la croissance de la souche A1552 sauvage et $\Delta ompV$

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer la croissance bactérienne de la souche sauvage et celle déplétée pour le gène *ompV* ($\Delta ompV$). L'objectif était de déterminer si la délétion engendre des retards de croissance chez *V. cholerae*.

En absence de PAM, que ce soit pour la souche sauvage ou $\Delta ompV$, la phase stationnaire débute après environ 250 minutes de culture. En phase stationnaire, la D.O des cultures atteint environ 4 (sans unité, s.u) (**Figure 10**). Nous n'avons pas observé de différences de croissances entre les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage wt ou mutante $\Delta ompV$ en l'absence de PAM (**Figure 10**).

Croissance des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 en milieu LB non supplémenté

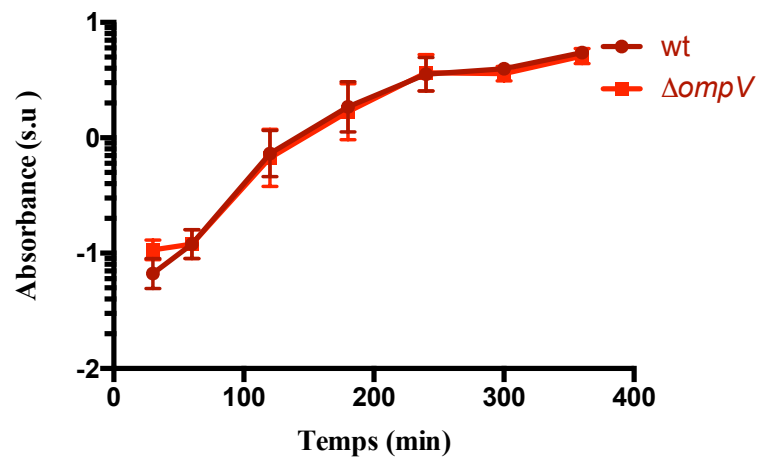


Figure 10 : Croissance des souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$) – Les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt, rouge bordeaux) et mutante ($\Delta ompV$, rouge vif) ont été mis en croissance en milieu LB. La densité optique (sans unité, s.u) à 600 nm est suivi.

Par la suite, nous avons souhaité déterminer les conditions de travail en PAM (LL-37 et PmB) adéquates, c'est à dire les concentrations en PAM qui ne modifieront pas la croissance de la bactérie. Pour ce faire, les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante ont été cultivées en présence de différentes concentrations en PAM.

En présence de concentrations de 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ en LL-37, nous avons observé une diminution de la vitesse de croissance par rapport à la croissance bactérienne en milieu non supplémenté en PAM. *A contrario* pour des concentrations en LL-37 de 6.25 ; 3.125 ou 1.5625 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ nous n'avons pas observé de différences pourront être utilisées pour les différents tests fonctionnels en (**Figure 11**).

Croissance des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 en milieu LB supplémenté à différentes concentrations en LL-37

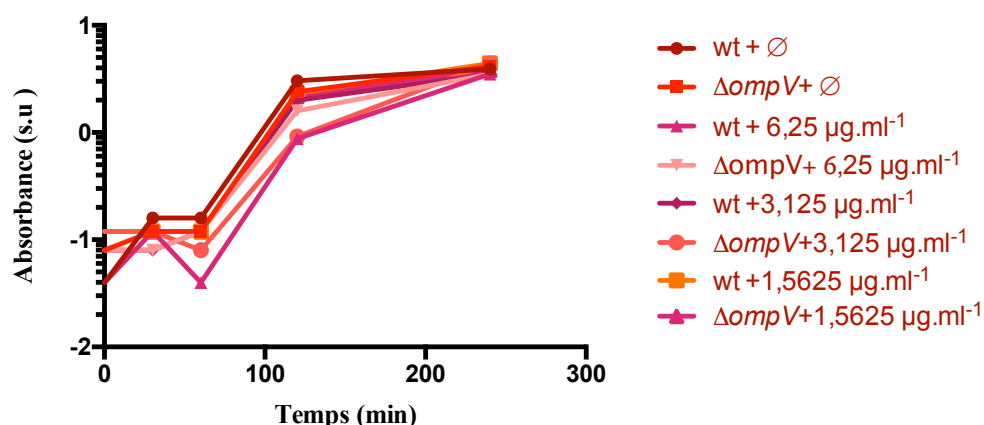


Figure 11 : Croissance des souches *V. cholerae* en présence de différentes concentrations en LL-37– *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante ont été cultivées en milieu LB supplémenté avec différentes concentrations en LL-37. La densité optique à 260 nm est suivie. ∅: Aucune supplémentation en PAM du milieu. Présentation d'une sur trois expériences indépendantes

Les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante (*DompV*) ont également été cultivées en présence de différentes concentrations en PmB. Aucun retard de croissance n'a été observé en présence de concentrations en PmB équivalentes à 25 µg.ml⁻¹, 12,5 µg.ml⁻¹ ou 6,25 ng.ml⁻¹ (**Figure 12**). Ces concentrations en PmB ne modifient pas la croissance des souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage et mutante et sont donc apparues comme des concentrations de travail intéressantes.

Croissance des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 en milieu LB supplémenté à différentes concentrations en PmB

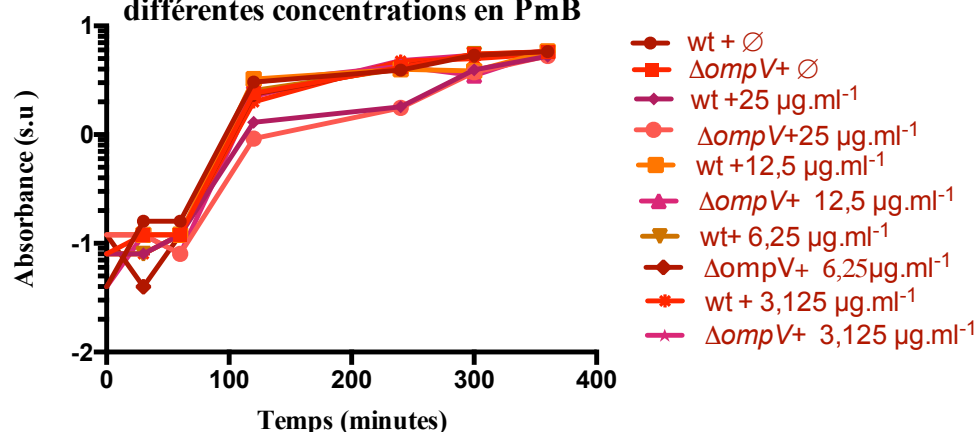


Figure 12 : Croissance des souches *V. cholerae* en présence de différentes concentrations en PmB– *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante ont été cultivée en milieu LB supplémenté avec différentes concentrations en PmB. La densité optique à 600 nm est suivie. O: Aucune supplémentation en PAM du milieu. Présentation d’une expérience sur trois expériences indépendantes

Grâce à ces suivis de croissance, nous avons pu déterminer qu’en milieu LB non supplémenté en PAM, la souche *V. cholerae* O1 El Tor mutante $\Delta ompV$ ne présente pas de retard de croissance par rapport à la souche sauvage. De plus, nous avons déterminé que des concentrations en LL-37 ou PmB qui sont respectivement de 6.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 3.125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ou 1.5625 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et 12.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 6.25 et 3.125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ne modifient pas la croissance des souches sauvages et mutantes et sont donc des conditions de travail adéquates pour les futurs tests.

3.2.2. Concentrations minimales inhibitrices

Dans un second temps, les concentrations minimales inhibitrices des différents PAM ont été déterminées. Pour ce faire, les souches *V. cholerae* A1552 sauvage et mutante $\Delta ompV$

ont été mises en présence de différentes concentrations en PAM. L'objectif était de tester les souches sauvages et mutantes face à différents PAM : PmB, LL-37 et B-défensines.

Les croissances des souches A1552 sauvages et mutantes $\Delta ompV$ seraient inhibées par une concentration en PmB d'environ 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 13**). Il n'y aurait pas de différences de sensibilité entre les souches sauvages et mutantes face à la PmB.

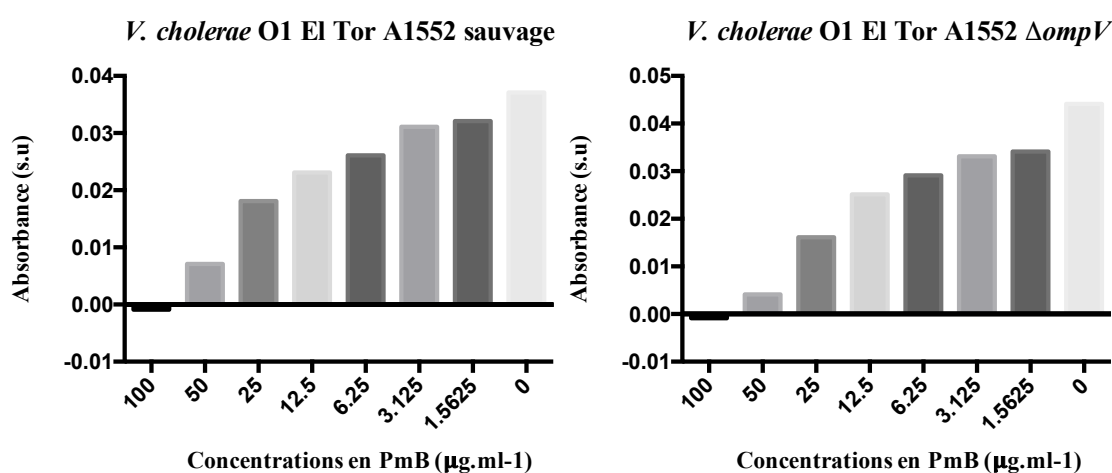


Figure 13: Concentrations minimales inhibitrices en polymyxine B (PmB) pour les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$). Après culture en milieu Poor Broth (PB), les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (à gauche) et mutante $\Delta ompV$ (à droite) ont été exposées à différentes concentrations en PmB durant 24h puis l'absorbance des cultures (sans unité, s.u) à 600 nm a été mesurée au spectrophotomètre. Présentation d'une expérience sur série de trois expériences

En présence de LL-37, une inhibition de croissance bactérienne pour la souche A1552 sauvage est observée avec une concentration de 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ en PAM alors que pour la souche $\Delta ompV$, une inhibition de culture est observée lorsque la concentration est à 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 14**).

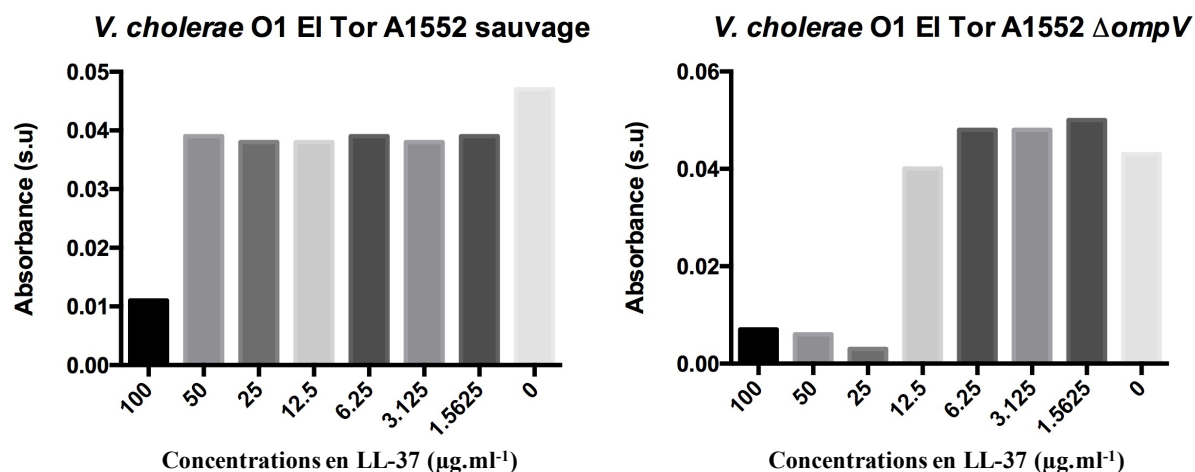


Figure 14: Concentrations minimales inhibitrices en LL-37 pour les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$). Après culture en milieu Poor Broth (PB), les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (à gauche) et mutante $\Delta ompV$ (à droite) ont été exposées à différentes concentrations en LL-37 durant 24h puis l'absorbance (sans unité; s.u) des cultures a été mesurée au spectrophotomètre. Présentation d'une sur trois expériences

Toujours dans l'objectif d'évaluer la sensibilité du mutant *V. cholerae* $\Delta ompV$ face à différents PAM présents dans le laboratoire, les CMI ont également été évaluées pour une β -défensine. Nous n'avons pas observé d'inhibition. Ainsi les concentrations minimales inhibitrices sont supérieures à $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour la souche sauvage et mutante (**Figure 15**).

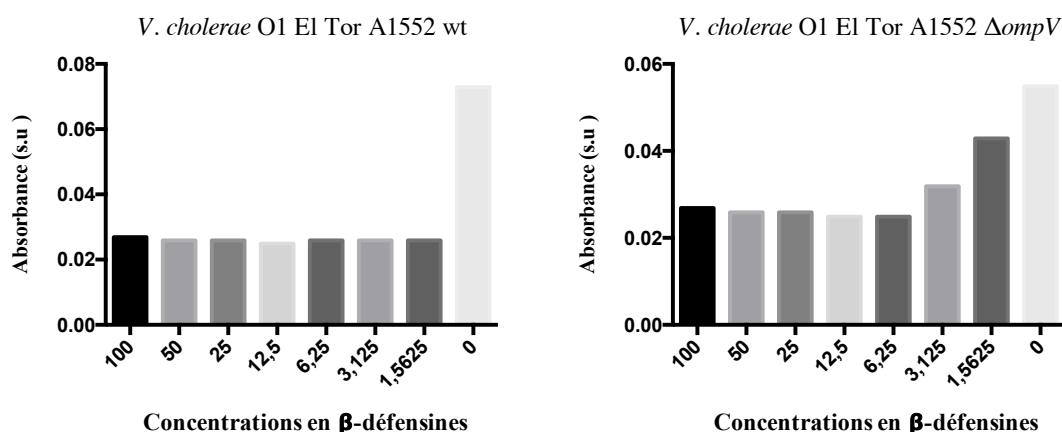


Figure 15: Concentrations minimales inhibitrices en β -défensines pour les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$). Après culture en milieu Poor Broth (PB), les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (à gauche) et mutante $\Delta ompV$ (à droite) ont été exposées à différentes concentrations en β -défensines durant 24h puis l'absorbance (sans unité; s.u) des cultures a été mesurée au spectrophotomètre. Présentation d'une sur série de trois expériences

Ainsi, ces expériences nous ont permis d'observer que la souche mutante *V. cholerae* A1552 $\Delta ompV$ montre une sensibilité plus accrue que la souche sauvage face à LL-37, confirmant l'implication d'OmpV dans la résistance de *V. cholerae* O1 El Tor A1552 face à ce PAM. De plus, nous avons pu déterminer les concentrations minimales inhibitrices (Tableaux 2) ainsi que des conditions de travail souhaitables pour la souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante en PmB et LL-37. Après compilation des données des expériences de croissance bactérienne et de CMI, nous avons déterminé qu'en PmB des concentrations de 12.5 et 6,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ étaient des conditions de travail adéquates, elles sont équivalentes à $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$ de la CMI en PmB des souches. En LL-37, nous avons déterminé que des concentrations de 6.25 ; 3.125 et 1.5625 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ étaient des conditions de travail adéquates, équivalentes à $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{8}$ et $\frac{1}{16}$ de la CMI en LL-37 de la souche mutante.

	CMI <i>V.cholerae</i> A1552 sauvage	CMI <i>V. cholerae</i> A1552 mutante ($\Delta ompV$)
LL-37	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
PmB	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Tableau 2 : CMI en LL-37 et PmB pour les souches *V. cholerae* A1552 sauvage et mutante $\Delta ompV$. Les tests de détermination des CMI sont effectués en milieu PB, les CMI sont rapportées en $\mu\text{g/ml}$

3.2.3 Caractérisation de la perméabilité membranaire

Par la suite, nous avons souhaité savoir si la délétion du gène *ompV* chez la souche *V. cholerae* A1552 modifiait la perméabilité membranaire face aux PAM. Pour ce faire, nous avons utilisé la cytométrie en flux. Deux marqueurs ont été utilisés : le SYTO9 et l'iodure de propidium (IP).

La stratégie d'analyse utilisée était d'aller sélectionner une population correspondant à *V. cholerae* via la taille et la granulométrie des cellules (**Figure 16A**). Par la suite, via le SYTO 9, les bactéries sont distinguées des débris éventuels (présent dans le PBS, le cytomètre, etc. **Figure 16B**). Enfin dans la population *V. cholerae* SYTO 9+ nous avons observé le marquage en IP nous permettant d'évaluer l'intégrité de la membrane (**Figure 16C**).

Nous n'avons pas observé de différences entre les souches sauvages et mutantes au niveau du marquage au SYTO 9. En effet, quelles que soient les concentrations en PmB utilisées, nous avons observé une population de 65% de cellules SYTO 9+ chez la souche *V. cholerae* A1552 sauvage. Pour la souche *V. cholerae* A1552 mutante $\Delta ompV$, nous avons observé une population d'environ 47% de SYTO 9+ (**Figure 16**).

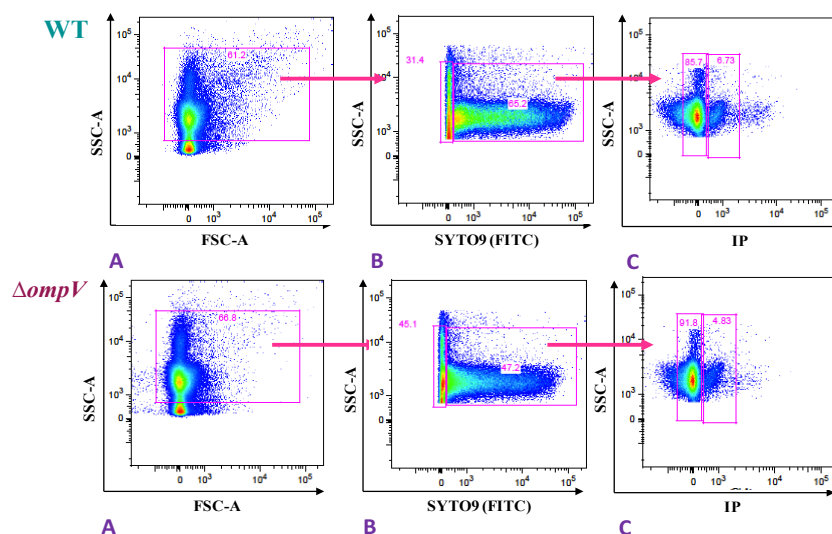


Figure 16: Stratégie d'analyse- La perméabilité membranaire est analysé chez les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt, en haut) ou mutante ($\Delta ompV$, en bas). L'analyse au cytomètre en flux nous permet de sélectionner via les paramètres SSC-A, FSC-A et un marquage au SYTO 9 (A et B), les cellules de *V. cholerae*. Les populations IP+/IP- sont évaluées (C).

En absence de PmB la population de cellules IP+ est équivalente entre la souche sauvage et mutante, il n'y aurait donc pas de différence de perméabilité entre la souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante $\Delta ompV$. *A contrario* après traitement à la PmB, nous avons observé une population marquée plus importante pour la souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 $\Delta ompV$ (35%) en comparaison avec la souche sauvage (4%) lorsque les cultures ont été exposée à $\frac{1}{4}$ de la CMI en PmB. En présence d' $\frac{1}{8}$ de la CMI en PmB, nous avons observé une population marquée à l'IP comparable entre les souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (11%) et mutante (6%) (**Figure 17**).

Sur des cellules *V. cholerae* SYTO 9+

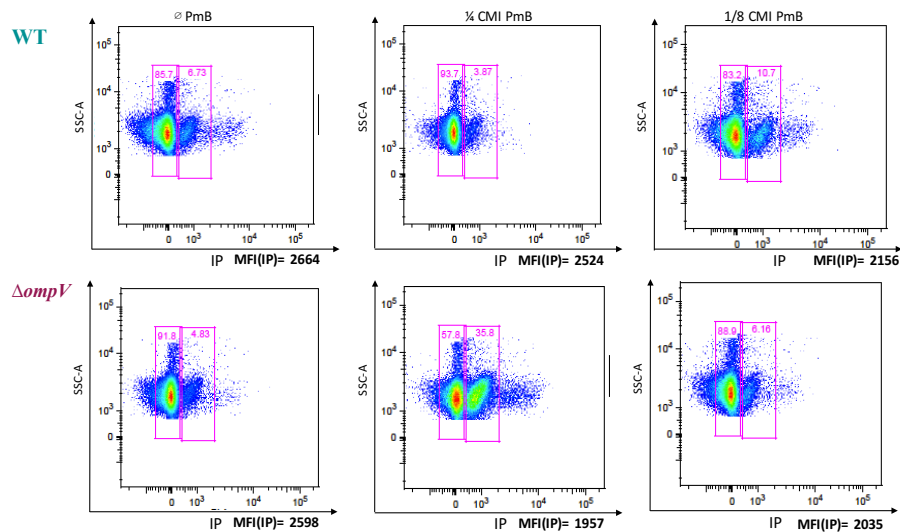


Figure 17: Evaluation de la perméabilité membranaire avec les marqueurs SYTO 9 et IP par la cytométrie en flux- Après culture avec différentes concentrations en PmB (\emptyset PmB, 1/4 CMI ou 1/8 CMI PmB, de gauche à droite), la perméabilité des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (wt, en haut) et mutante ($\Delta ompV$, en bas) ont été évaluée par cytométrie en flux avec marquage SYTO 9 et IP. Les valeurs de Mean Fluorescence Intensity, MFI (IP) sont répertoriées aux bas des graphiques. N=1

Ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois et nécessitent d'être répétées. Cependant, compte tenu des observations faites avec le double marquage IP/SYTO 9, il semblerait qu'en absence de PmB, la souche mutante $\Delta ompV$ ne soit pas plus perméable que la souche sauvage (**Figure 17**). En présence de concentrations équivalentes à 1/4 de la CMI, la souche mutante apparaît comme plus perméable (**Figure 17**). Ces résultats confirmeraient l'implication d'OmpV dans les mécanismes de résistance de *V. cholerae* aux PAM.

3.3. Identification du mécanisme de résistance de *V. cholerae* aux PAM via OmpV

Duperthuy et al.¹⁷⁵ ont montré une augmentation de la présence de la porine OmpV mais aussi de Bap1 ou encore OmpW à la membrane des vésicules de sécrétion en présence de PmB et LL-37¹⁷⁵. L'étude conclut à une implication de Bap1 dans la résistance de *V. cholerae* aux PAM. En effet, Bap1 se lierait aux vésicules de sécrétion et ainsi les PAM, et plus particulièrement LL-37, se lieraient à Bap1, entraînant une diminution de la concentration de LL-37 dans l'environnement de *V. cholerae*, augmentant ainsi la résistance de la bactérie face à ce PAM.

Nous avons alors posé l'hypothèse que le mécanisme de résistance de *V. cholerae* aux PAM via OmpV se rapporterait à un mécanisme de dilution (Section 1.3.2.3). En effet, en présence de PAM, OmpV serait exportée à la surface des vésicules de sécrétion. Certains PAM dont LL-37 ou la PmB auraient une affinité pour OmpV et se lieraient alors à la protéine, entraînant une diminution de la concentration de PAM à l'environnement bactérien.

Pour tester cette hypothèse, nous avons souhaité effectuer un test de protection aux vésicules de sécrétion. En effet, si cette hypothèse est juste, les vésicules de sécrétion issues de la souche sauvage pourraient protéger la souche mutante de l'effet de la PmB ou de LL-37.

Nous avons donc isolé des OMV des souches *V. cholerae* sauvage et mutante $\Delta ompV$ (respectivement OMVwt et OMV $\Delta ompV$). Ces OMV isolées ont été mis en présence des bactéries sauvages ou mutantes (wt ou $\Delta ompV$) dépourvues de vésicules et confrontées à des gammes de concentrations de PmB et LL-37. *In fine*, nous avons déterminé les CMI des combinaisons : wt_OMVwt ; wt_OMV $\Delta ompV$; $\Delta ompV$ _OMVwt ; $\Delta ompV$ _OMV $\Delta ompV$.

Un gel SDS-PAGE nous a permis d'évaluer le profil protéique des différentes extractions de vésicules. Un volume équivalent a été déposé dans chaque puit et nous avons observé des quantités protéiques très variables d'une expérience à l'autre : dans certaines extractions, la quantité en protéines et donc en vésicules isolées semblait supérieure chez la souche A1552 sauvage. Dans d'autres extractions, c'est avec la souche A1552 $\Delta ompV$. Ces résultats ne nous ont pas permis de conclure s'il existait des différences dans la quantité d'OMV sécrétée par la souche sauvage et mutante (**Figure 18**).

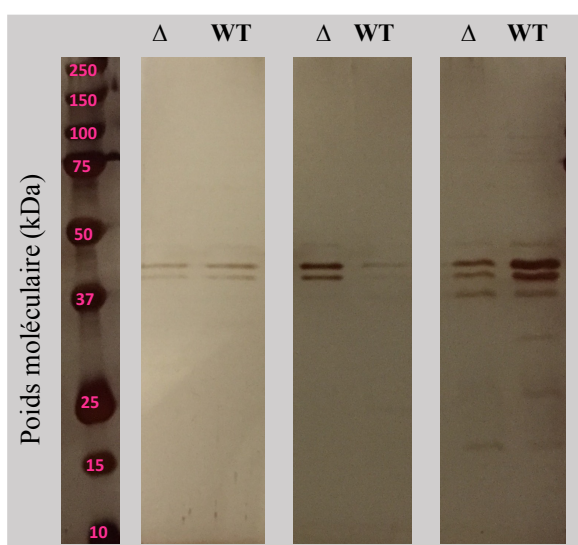


Figure 18 : Gel SDS-PAGE des solutions de vésicules purifiées *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante $\Delta ompV$. A partir de culture de souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage (WT, à droite) ou mutante $\Delta ompV$ (Δ , à gauche), les vésicules de sécrétion ont été extraites. Les protéines présentes dans ces extraits ont été visualisées après migration et coloration au nitrate d'argent. Ici sont présentés les extraits obtenus lors de trois expériences indépendantes.

Par la suite, nous avons évalué la protection conférée par les vésicules sauvages et $\Delta ompV$ face aux PAM pour les souches *V. cholerae* A1552 sauvages ou mutantes $\Delta ompV$.

Les vésicules après isolation ont été resuspendues dans du PBS à une concentration physiologique (1X).

Aucune inhibition de croissance n'a été observé (**Figure 19**), que ce soit pour les souches sauvages ou mutantes exposées aux vésicules issues des souches sauvages ou mutantes. Or,

lorsque nous avons déterminé que les concentrations minimales inhibitrices pour les souches sauvages et $\Delta ompV$ étaient respectivement de 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Nous avons postulé qu'une concentration en OMV équivalente à 1X était trop élevée.

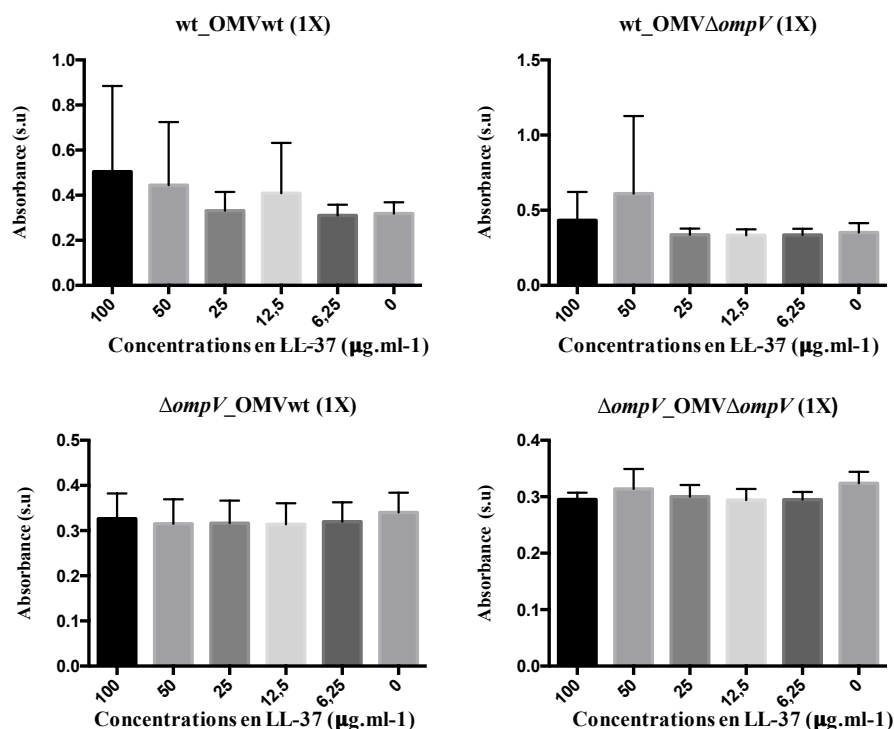


Figure 19: Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion en présence de LL-37- Dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations en LL-37, les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$) ont été mises en présence de vésicules purifiées à partir de culture sauvage ou mutante. La concentration des vésicules de sécrétion est équivalente à la concentration physiologique (1X). Après 24h, la densité optique (Absorbance, sans unité, s.u) à 600 nm des différentes cultures a été évaluée. N=4

Les expériences ont également été faites en présence de PmB (**Figure 20**). Comme attendu, nous avons observé une inhibition pour une concentration 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ en PAM que ce soit pour la souche *V. cholerae* O1 El Tor sauvage ou mutante en présence de vésicules isolées à partir de la souche sauvage (OMV wt) et de la souche mutante (OMV $\Delta ompV$) (**Figure 20**).

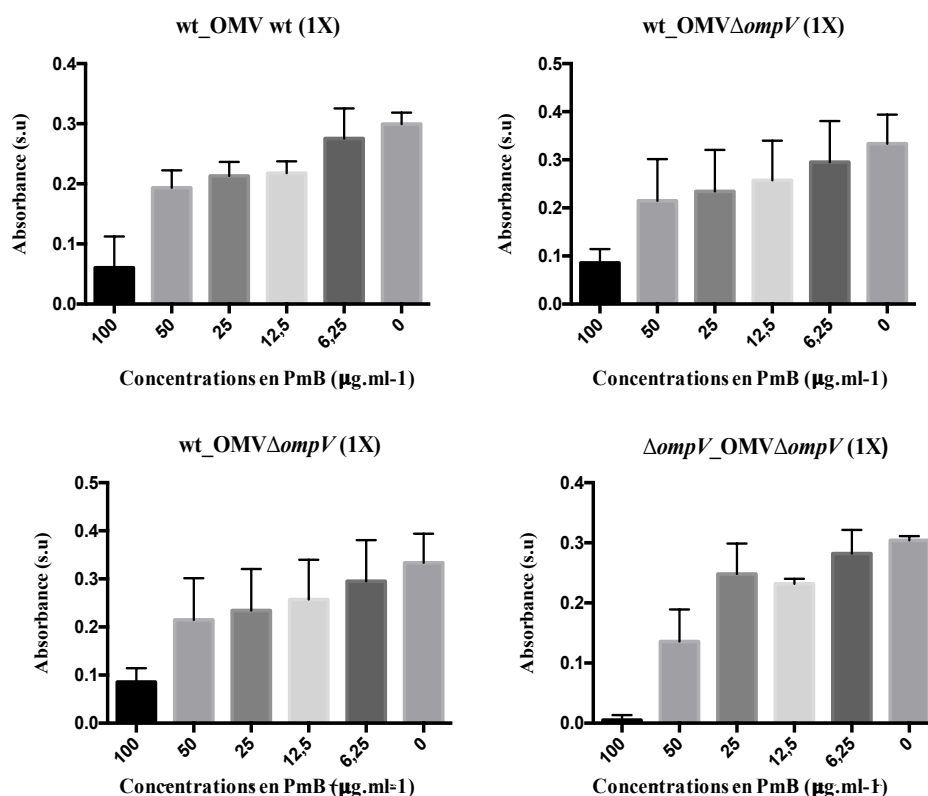


Figure 20: Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion en présence de PmB. Dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations en PmB, les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$) ont été mis en présence de vésicules purifiées à partir de culture sauvage ou mutante. La concentration des vésicules de sécrétion est équivalente à la concentration physiologique (1X). Après 24h, la densité optique à 600 nm (Absorbance, sans unité s.u) des différentes cultures a été évaluée. N=4

Nous avons alors souhaité tester des solutions de vésicules de sécrétion à des concentrations équivalentes à un dixième de la concentration physiologique (1/10X). En présence de différentes concentrations en LL-37, nous n'avons pas observé de différences pour la souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage en présence de vésicules issues d'une culture de souche sauvage ou mutante ($\Delta ompV$) (**Figure 21**). Toutefois, nous avons observé avec la souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 mutante $\Delta ompV$ qu'en présence de vésicules de sécrétion à 1/10X issues de la souche sauvage, la CMI est de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et en présence de vésicules de sécrétion à 1/10X issus de la souche mutante ($\Delta ompV$) à 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure**

21). Ces résultats suggèrent une protection de la souche *V. cholerae* O1 El Tor en présence de vésicules issues de la souche sauvage. Ces expériences n'ont été réalisés qu'une fois et doivent donc être répétées.

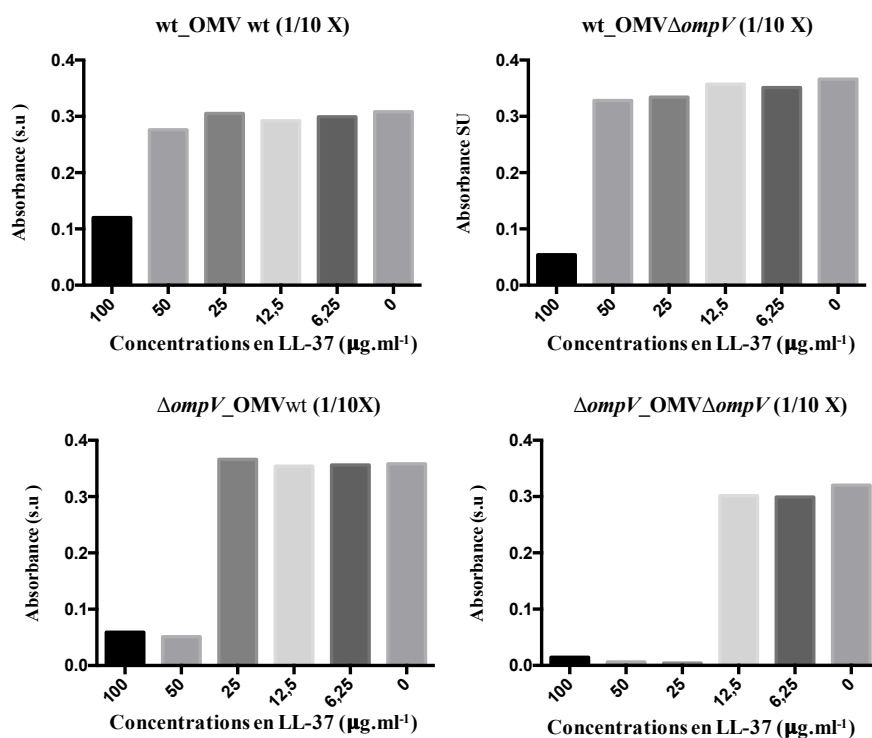


Figure 21: Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion à concentration (1/10X) en présence de LL-37- Dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations en LL-37, les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$) ont été mis en présence de vésicules purifiées à partir de culture sauvage ou mutante. La concentration des vésicules de sécrétion est équivalente à un dixième de la concentration physiologique (1/10X). Après 24h, la densité optique (Absorbance, sans unité, s.u) à 600 nm des différentes cultures a été mesurée.
N=1

Une expérience similaire a été faite en présence de PmB avec des concentrations équivalentes à un dixième de la concentration physiologique en vésicules. Nous avons alors observé que ce soit pour la souche *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage ou mutante et que ce soit avec les vésicules issues de la culture de la souche sauvage ou mutante une CMI à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 22**). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de différences de sensibilité à la PmB entre les souches *V. cholerae* A1552 sauvage et mutante.

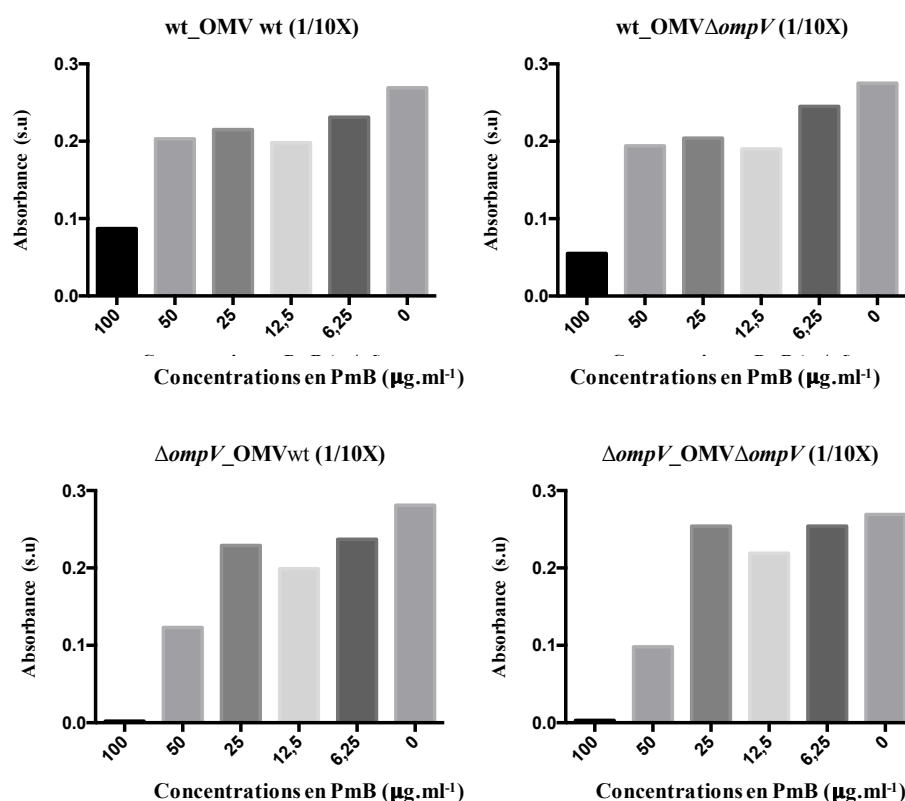


Figure 22: Protection des souches *V. cholerae* O1 El Tor A1552 sauvage et mutante par les vésicules de sécrétion à concentration (1/10X) en présence de PmB- Dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations en PmB, les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage (wt) et mutante ($\Delta ompV$) ont été mis en présence de vésicules purifiées à partir de culture sauvage ou mutante. La concentration des vésicules de sécrétion est équivalente à un dixième de la concentration physiologique (1/10X). Après 24h, la densité optique (Absorbance, sans unité, s.u) à 600 nm des différentes cultures a été mesurée. N=1

Ces observations suggèrent une protection de la souche mutante $\Delta ompV$ par les vésicules issues de la souche sauvage face à LL-37. Ainsi, les vésicules riches en OmpV pourraient offrir une protection et ainsi augmenter la résistance de la bactérie à LL-37. Toutefois, il convient d'être prudent face à ces résultats, compte tenu du profil surprenant des solutions de vésicules purifiées obtenues en SDS-PAGE. En parallèle, le mutant $\Delta ompV$ ne serait pas plus sensible à la présence de PmB que la souche sauvage, la porine OmpV n'offrirait donc pas de protection à *V. cholerae* A1552 face à la PmB. Ces expériences doivent être répétées et d'autres contrôles qualitatifs doivent être effectués (cf section 4.2).

3.3 Caractérisation du rôle de OmpV dans la virulence de *V. cholerae*.

Comme nous l'avons vu précédemment, la résistance aux PAM constitue un mécanisme de virulence. En effet, les mécanismes de virulence se définissent comme les mécanismes permettant à la bactérie de se répliquer chez l'hôte et *in fine* de se disséminer dans l'environnement. Ainsi, de nombreux mécanismes de résistance aux PAM ont été montrés comme ayant un impact sur la virulence de la bactérie chez l'hôte. Nous avons donc souhaité déterminer si la délétion d'*ompV* avait un impact sur la virulence de *V. cholerae*.

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser le modèle *D.melanogaster*. Ce modèle est particulièrement intéressant dans notre cas puisqu'il mime les caractéristiques de l'infection chez l'Homme (perte de poids, voies de réponse immunitaire, virulence dépendante de la TC et TCP,...) ^{187. 188}. Les expériences qui suivent ont été réalisées dans le cadre de notre collaboration avec Dr. Eric Déziel (Institut Armand Frapier, INRS).

L'objectif de cette expérimentation est de caractériser la colonisation par la souche sauvage *V. cholerae* A1552 et la souche mutante $\Delta ompV$. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions optimales d'infection. Pour ce faire, différentes concentrations en bactéries *V. cholerae* A1552 sauvages ont été utilisées pour infecter *D. melanogaster*. En effet, après croissance bactérienne, *V. cholerae* A1552 sauvage a été resuspendu en milieu LB à concentration 1X ou 10X, puis ces cultures ont été déposées sur papier buvard pour permettre l'ingestion par les animaux. Lorsque les bactéries ont été concentrées à 1X, le pourcentage d'animaux qui survivent est très élevé, aux environs de 90 % après 180 heures, quasi équivalent aux témoins (milieu LB seul) alors que lorsqu'on utilise les bactéries concentrées 10X, le pourcentage de survie est aux alentours de 25 % après 180 heures.

Courbe de survie de *D. melanogaster* après infection par *V. cholerae* O1 El Tor A1552

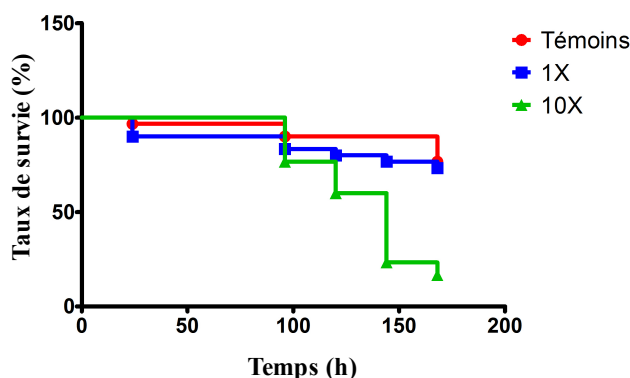


Figure 23: Mise au point expérimentale de la caractérisation du rôle de OmpV dans la virulence de *V. cholerae* chez le modèle *D. melanogaster*. Après croissance bactérienne, des concentrations équivalentes à un bouillon de culture 16h de *V. cholerae* O1 El Tor A1552 wt (1X, en bleu) ou 10 fois concentrées (10X en vert) ont été déposées sur papier buvard pour permettre l'ingestion par *D. melanogaster*. La survie des animaux a ensuite été suivie durant 200 heures. Expérimentations faites par le laboratoire du Dr. Eric Déziel (INRS, Laval).

Ces résultats sont encourageant mais il est surprenant d'obtenir un pourcentage de survie si haut à 200 heures avec une culture concentrée 1X. Une optimisation du protocole pourrait être effectuée.

L'ensemble de l'étude nous a permis d'identifier OmpV comme impliquée dans le mécanisme de résistance de *V. cholerae* aux PAM tels que LL-37. En effet, les résultats de spectrométrie de masse combinés à une étude bibliographique, nous ont permis d'identifier la porine OmpV ainsi que la protéase Lap comme des protéines pouvant être impliquée dans des mécanismes de résistance aux PAM chez *V. cholerae*.

Nous avons caractérisé le mutant *V. cholerae* O1 El Tor A1552 $\Delta ompV$. Dans un premier temps, nous avons observé des concentrations minimales inhibitrices en LL-37 diminuées chez le mutant, confirmant l'implication d'OmpV dans les mécanismes de résistance aux PAM. Ensuite, nous avons déterminé qu'en absence de PAM, les souches *V. cholerae* O1 El Tor sauvage et mutante ne présentent pas de différences de croissance ou dans leur perméabilité. En présence de PAM, nos résultats suggèrent une perméabilité membranaire augmentée chez la souche $\Delta ompV$.

Nos premiers résultats semblent suggérer une protection de la souche mutante $\Delta ompV$ par les vésicules de la souche sauvage face à LL-37.

Les conditions adéquates d'infection pour *D. melanogaster* par *V. cholerae* A1552 sauvage doivent encore être optimisées.

4. Discussion

L'organisation mondiale de la santé estime que le choléra est encore un enjeu de santé publique majeur ². Les PAM présentent une activité antimicrobienne et sont produits de façon constitutive ou en réponse à une infection par de nombreux types cellulaires tels que les cellules de l'épithélium intestinal, les leucocytes ou par les bactéries du microbiote intestinal. Ces peptides, souvent chargés positivement, s'associent à la membrane bactérienne chargée négativement par liaisons électrostatiques.

Les bactéries pathogènes ont acquis au cours du temps de nombreuses mutations spontanées entraînant des mécanismes de résistance aux PAM comme l'altération de la charge membranaire, les mécanismes d'efflux, ou le clivage protéolytique.

Comme nous l'avons décrit en introduction de ce mémoire, les mécanismes de résistance développés par les bactéries sont de nature très diverse. Cependant nos connaissances sur le sujet restent parcellaires majoritairement dues aux modes de leur mode d'identification majoritairement par mutagenèse aléatoire.

Des expériences préliminaires dans notre laboratoire ont été réalisées. La souche A1552 de *V. cholerae* a été cultivée en présence ou en absence de PAM (PmB, Lactocine 705, Microcine-C7). Les protéines des culots et des surnageants bactériens ont ensuite été quantifiées et identifiées via séquençage par spectrométrie de masse (MS-MS) suivie d'une analyse bio-informatique. Nous avons comparé le protéome de *V. cholerae* quand celle-ci est exposée ou non aux PAM.

Au cours de cette analyse, nous avons déterminé que la porine OmpV et la protéase Lap pourraient être impliquées dans les mécanismes de résistance chez *V. cholerae*. Par la suite, nous avons caractérisé le mutant $\Delta ompV$, qui était déjà disponible dans le laboratoire. Nous avons alors observé une diminution des concentrations minimales inhibitrices en LL-37, confirmant l'implication de la porine OmpV dans un mécanisme de résistance de la

souche *V. cholerae* A1552 aux PAM. Nos résultats semblent suggérer l'implication des vésicules de sécrétion dans le rôle de OmpV dans la résistance de *V. cholerae* O1 El Tor face à LL-37. Enfin, nos collaborateurs sont en train de mettre au point les conditions d'infection de *D. melanogaster* pour l'étude de l'impact des mécanismes de résistance aux PAM sur la virulence de *V. cholerae*.

4.1. Identification des protéines impliquées dans les mécanismes de résistance aux PAM

Afin d'identifier les protéines impliquées dans les mécanismes de résistance de *V. cholerae* aux PAM, le protéome de la bactérie a été évalué en présence ou non de PAM. Ces résultats encourageants nous ont permis d'identifier la porine OmpV et la protéase Lap comme potentiellement impliquées dans des mécanismes de résistance. Par la suite, d'autres protéines candidates potentiellement impliquées dans des mécanismes de résistance pourront être identifiées.

L'expérience de protéomique doit être répétée et préférentiellement avec un mélange de différentes cultures pour plus de représentativité. De plus dans de futurs travaux, il serait intéressant d'utiliser un autre PAM : LL-37. En effet, lorsque les expériences ont été faites, les PAM d'origine bactérienne ont été favorisés et il serait intéressant de confronter ces résultats à la présence d'un PAM d'origine humaine. Il serait également intéressant de valider les résultats obtenus via des expériences d'immuno-buvardage pour la présence de la protéine OmpV, Lap ainsi que d'autres protéines dans la fraction sécrétée, cytoplasmique

ou membranaire chez *V. cholerae* en présence de LL-37. L'expression des gènes codants sera également évaluée par PCR quantitative.

Afin d'étendre l'étude à d'autres protéines candidates, il est nécessaire de construire le mutant *V. cholerae* O1 El Tor A1552 Δlap .

4.2. Caractérisation du mutant $\Delta ompV$

Le mutant $\Delta ompV$ était disponible dans le laboratoire. Ce mutant a été obtenu selon la méthodologie rapportée par Vaitkevicius et al.³⁷. Tout d'abord, nos résultats nous ont montré que le mutant $\Delta ompV$ ne présente pas de retard de croissance en absence de PAM par rapport à la souche sauvage ou en milieu LB supplémenté en LL-37 ou PmB. Ensuite, la détermination des concentrations minimales inhibitrices en PAM nous a permis d'observer une sensibilité accrue de la souche mutante en présence de LL-37, confirmant l'implication de la porine OmpV dans les mécanismes de résistance de *V. cholerae*. Enfin, via l'utilisation de la cytométrie en flux, nous avons évalué la perméabilité membranaire de la souche sauvage et mutante. Comme chez Giacomucci et al.¹⁸⁹, l'utilisation du double marquage IP et SYTO 9 semble adapté à notre modèle. Nos résultats laissent suggérer qu'il n'y a pas de différences de perméabilité entre les souches sauvages et mutantes en milieu LB en absence de PmB. En présence de concentrations équivalentes à 1/4 de la CMI en PmB, la souche mutante semble être plus perméable. Il serait nécessaire de confirmer ces résultats en répétant les expériences. De plus, il aurait été très intéressant de comparer la sensibilité de la souche sauvage et mutante face à des PAM bactériens utilisés lors de l'expérience de

protéomique. Enfin, nous souhaiterions effectuer les expériences de cytométrie mais en présence d'autres PAM que la PmB, principalement LL-37.

Pour valider notre modèle, le mutant $\Delta ompV$. Tout d'abord, l'expression de *vprA* et *vprB* pourrait être vérifiée. En effet, comme rapporté plus haut, le gène *ompV* est organisé en opéron avec les gènes *vprA* et *vprB* (**Figure 24**)¹⁹⁰. Nous souhaitons donc valider l'intégrité génétique de notre mutant $\Delta ompV$. Ensuite, nous souhaiterions caractériser les vésicules de sécrétion du mutant $\Delta ompV$. Pour ce faire nous souhaitons visualiser ces structures par microscopie électronique comme l'ont fait Duperthuy *et al.* (2013)¹⁷⁵. Nous évaluerons ainsi la taille et l'abondance de ces structures. Ensuite, nous souhaiterions construire un plasmide transportant le gène *ompV*, afin d'effectuer des tests de complémentation sur le mutant $\Delta ompV$. La surexpression d'*ompV* ne devrait pas être létale et nous devrions alors observer chez le mutant complémenté des réponses comparables à la souche sauvage *V. cholerae* O1 El Tor A1552.

Lorsque d'autres mutants délétés pour les gènes codant pour les protéines candidates seront disponibles, nous caractériserons ces souches mutantes comme nous l'avons fait pour le mutant $\Delta ompV$.

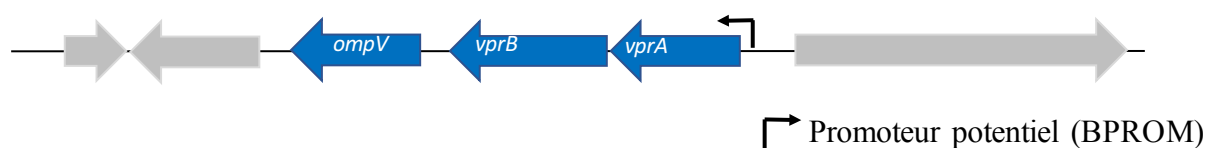


Figure 24: Organisation génique de l'opéron *ompV/vprA/vprB*- Le gène *ompV* est organisé en opéron avec les gènes *vprB* et *vprA*. L'opéron est sous le contrôle du promoteur (BPRM). Selon Heideberg *et al* et nos alignements de séquences

4.3. Identification des mécanismes de résistance d'OmpV aux PAM chez *V. cholerae*

Notre hypothèse de départ était que le mécanisme de OmpV était un mécanisme similaire aux mécanismes mis en avant par Duperthuy et *al.*¹⁷⁵, c'est à dire un mécanisme attribuable à un mécanisme de dilution des PAM. En présence de PAM, la protéine est présente en quantité plus abondante au niveau de la membrane des vésicules de sécrétion et permet ainsi une dilution du PAM. Le seuil de tolérance de *V. cholerae* aux PAM est alors augmenté.

Pour tester notre hypothèse, nous avons isolé les vésicules des souches *V. cholerae* sauvages et mutantes $\Delta ompV$. Une première difficulté dans ces expériences a été de déterminer la concentration adéquate en vésicules. Nos observations suggèrent qu'une concentration équivalente à une concentration physiologique (1X) serait trop importante et des concentrations équivalentes à 1/10 X serait meilleure. Ces résultats doivent être confirmés. En effet, compte tenu des résultats que nous avons observés en gel SDS-PAGE, les solutions de vésicules de sécrétion pourraient avoir été contaminées avec des débris de membrane bactérienne. Pour vérifier cela, nous pourrions observer en microscopie électronique nos solutions de vésicules de sécrétion. Si nous observons une contamination, nous pourrions ajuster les conditions expérimentales via la modification des conditions d'ultracentrifugation ou encore la modification des étapes de filtration.

Les résultats en présence de LL-37 suggèrent une protection des vésicules de la souche sauvage face à la souche mutante. Ces résultats suggèrent donc l'implication de OmpV des vésicules de sécrétion dans le mécanisme de résistance de *V. cholerae* O1 El Tor face à LL-37.

Après avoir vérifié la pureté de nos solutions de vésicules, il faudra répéter les expériences. Pour confirmer nos résultats, les interactions entre les PAM, les vésicules de sécrétion et les bactéries seront visualisées en microscopie telles que fait chez Duperthuy *et al.* (2012). Nous pourrions nous attendre à observer une diminution de l'association PAM-vésicules de sécrétion issues de la souche mutante $\Delta ompV$ en présence de LL-37.

Nous souhaiterions aussi caractériser l'expression d'*ompV* en présence de PAM. Pour ce faire, des expériences de PCR quantitative pourraient être menées permettant d'évaluer l'expression d'*ompV* à différents temps de la culture microbienne ou en présence de différentes concentrations en PAM (LL-37 et PmB).

Il serait également intéressant de transformer des souches sensibles à la PmB ou à LL-37, comme les souches *V. cholerae* O1 classique ou une souche d'*E. coli* avec un plasmide codant pour *ompV* et évaluer si cette transformation induit un gain de fonction chez ces souches.

En parallèle, nous pourrions envisager d'effectuer une étude bioinformatique pour déterminer les cibles géniques potentielles de OmpV. *V. cholerae* sauvage ou mutante $\Delta ompV$ pourraient être cultivées en présence ou non de PAM et une expérience de séquençage d'ARN nous permettrait de déterminer les cibles directes ou indirectes de OmpV chez *V. cholerae* O1 El Tor A1552 en présence de PAM.

4.4. Caractérisation du rôle de OmpV dans la virulence de *V. cholerae*.

Un autre volet de cette étude a concerné le rôle des mécanismes de résistance dans la virulence de *V. cholerae*. En effet, les facteurs de virulence représentent les mécanismes

utilisés par la bactérie pour se répliquer chez l'hôte et *in fine* se disséminer. Les mécanismes de résistance aux PAM constituent alors de véritables facteurs de virulence.

Nous nous sommes demandés si le mécanisme de résistance aux PAM par OmpV chez *V. cholerae* avait un rôle dans la virulence de *V. cholerae*. Nous souhaitions donc évaluer la colonisation de la bactérie. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle se rapprochant fortement de l'infection humaine : *D. melanogaster*. Les premiers tests effectués par nos collaborateurs (Laboratoire E. Deziel, INRS) n'ont pas permis de définir les conditions optimales pour l'infection des mouches. Nous nous attendions à obtenir une mortalité plus importante chez les mouches, comparable aux données obtenues par Blow *et al*¹⁸⁸ avec *V. cholerae* O139.

Lorsque cet objectif sera atteint, nous pourrons mesurer la colonisation de *V. cholerae* chez *D. melanogaster* comme l'ont fait chez Blow *et al*¹⁸⁸. En sus, il faudrait évaluer la production de TC par la souche mutante *V. cholerae* A1552 $\Delta ompV$, via expérience d'immuno-buvardage.

L'ensemble de ces résultats nous permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en place par *V. cholerae* pour résister à l'action des PAM et d'évaluer leur impact sur la virulence de *V. cholerae*. Nous pourrons alors identifier certains PAM comme des outils thérapeutiques potentiels pour traiter l'infection à *V. cholerae*.

5. Conclusion

Les résultats de cette étude ont permis via la spectrométrie de masse combinée à une étude bibliographique, d'identifier la porine OmpV ainsi que la protéase Lap comme des protéines pouvant être impliquées dans des mécanismes de résistance aux PAM chez *V. cholerae*. Nous avons caractérisé la souche *V. cholerae* mutante $\Delta ompV$ qui était disponible au laboratoire. Cette dernière ne présente pas de défauts de croissance. Les concentrations minimales inhibitrices en LL-37 sont diminuées pour la souche *V. cholerae* mutante $\Delta ompV$, confirmant l'implication d'OmpV dans les mécanismes de résistance aux PAM. De plus, nos résultats de cytométrie suggèrent une perméabilité plus importante de la souche mutante en présence de PAM. Notre étude fonctionnelle semble montrer l'implication des vésicules de sécrétion dans le mécanisme d'OmpV dans la résistance de *V. cholerae* O1 El Tor A1552 face à LL-37. Enfin, nos collaborateurs optimisent les conditions d'infection pour *D. melanogaster* par *V. cholerae* A1552 sauvage. Grâce à cette étude, nous avons confirmé que certaines protéines dont l'expression est modifiée en présence de PAM pouvaient être impliquées dans des mécanismes de résistance. Des optimisations sont à prévoir pour déterminer le mécanisme par lequel la porine OmpV permet la résistance *V. cholerae* aux PAM. De plus, nous souhaitons construire un mutant Δlap pour évaluer le rôle de la protéase Lap.

Grâce à cette étude, nous pourrions mettre en évidence de nouvelles stratégies adoptées par *V. cholerae* liées à différentes protéines et ainsi envisager de nouveaux agents antimicrobiens pour le traitement de l'infection à *V. cholerae*.

Bibliographie

1. Iwanaga, M. & Kuyyakanond, T. Large Production of Cholera Toxin by *Vibrio cholerae* 01 in Yeast Extract Peptone Water. *J Clin Microbiol* 25(12): 2314-2316 (1987).
2. World Health Organization. *Ending Cholera*.
<http://www.who.int/cholera/publications/global-roadmap/en/>.
3. Morris, J. G. & Acheson, D. Cholera and Other Types of Vibriosis: A Story of Human Pandemics and Oysters on the Half Shell. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 272–280 (2003).
4. Koch, Robert. An Address on Cholera and its Bacillus. *Br Med J* 403–407 (1884).
5. Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T. & Calderwood, S. B. Cholera. *The Lancet* **379**, 2466–2476 (2012).
6. Codeço, C. T. Endemic and epidemic dynamics of cholera: the role of the aquatic reservoir. *BMC Infect. Dis.* **1**, 1 (2001).
7. Rahman, R., Chowdhury, M. A. R., Parveen, S., Sack, D. A. & Russek-Cohen, E. Detection of *Vibrio cholerae* 01 in the Aquatic Environment by Fluorescent-Monoclonal Antibody and Culture Methods. **56**, 4 (1990).
8. Hill, V. *et al.* Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in Water and Seafood, Haiti. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, (2011).
9. Deen, J. L. *et al.* The High Burden of Cholera in Children: Comparison of Incidence from Endemic Areas in Asia and Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e173 (2008).
10. Somboonwit C, Menezes LJ, Holt DA, Sinnott JT, Shapskhak P, Tampa, Current views and challenges on clinical cholera. *Bioinformation* **13**, 405–409 (2017).
11. Chatterjee, S. N. & Chaudhuri, K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. *Biochim.*

Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. **1639**, 65–79 (2003).

12. Pradhan, S., Baidya, A. K., Ghosh, A., Paul, K. & Chowdhury, R. The El Tor Biotype of *Vibrio cholerae* Exhibits a Growth Advantage in the Stationary Phase in Mixed Cultures with the Classical Biotype. *J. Bacteriol.* **192**, 955–963 (2010).
13. Barrett, T. J. & Blake, P. A. Epidemiological Usefulness of Changes in Hemolytic Activity of *Vibrio cholerae* Biotype El Tor During the Seventh Pandemic. **13**, 4 (1981).
14. Son, M. S., Megli, C. J., Kovacikova, G., Qadri, F. & Taylor, R. K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Variant Clinical Isolates from Bangladesh and Haiti, Including a Molecular Genetic Analysis of Virulence Genes. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3739–3749 (2011).
15. Villeneuve, Sylvain, Boutonnier, Alain, Mulard, L. A. & Fournier, J.-M. Immunochemical characterization of an Ogawa-Inaba common antigenic determinant of *Vibrio cholerae* O1. (1999).
16. Stroehrer, U. H., Karageorgos, L. E., Morona, R. & Manning, P. A. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* Proc Natl Acad Sci USA 89(7): 2566-2570 (1992).
17. Mutreja, A. *et al.* Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* **477**, 462–465 (2011).
18. Faruque, S. M., Ahmed, K. M., Siddique, A. K. & Zaman, K. Molecular Analysis of Toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal Strains Isolated in Bangladesh between 1993 and 1996: Evidence for Emergence of a New Clone of the Bengal Vibrios. *J Clin Microbiol* **35**, 8 (1997).
19. Huq, A. *et al.* Critical Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Environment of Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4645–4654 (2005).

20. Islam, Sirahul, Zaman, M.H, Ahmed, Niyaz & Clemens, J.D. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae*. *Vaccine*, 1,**A52-A62**(2019).
21. Wang, J., Yan, M., Gao, H., Lu, X. & Kan, B. *Vibrio cholerae* Colonization of Soft-Shelled Turtles. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00713-17, /aem/83/14/e00713-17.atom (2017).
22. Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S. & McDougald, D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* **4**: 375-(2013).
23. Meibom, K. L. *et al.* The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2524–2529 (2004).
24. Sakib, S. N., Reddi, G. & Almagro-Moreno, S. Environmental Role of Pathogenic Traits in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **200**, e00795-17, /jb/200/15/e00795-17.atom (2018).
25. Li, X. & Roseman, S. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 627–631 (2004).
26. Conner, J. G., Teschler, J. K., Jones, C. J. & Yildiz, F. H. Staying Alive: *Vibrio cholerae*'s Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. in *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition* (eds. Kudva, I. T. *et al.*) 593–633 (American Society of Microbiology, 2016). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.
27. Teschler, J. K. *et al.* Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 255–268 (2015).
28. Silva, A. J. & Benitez, J. A. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004330 (2016).
29. Utada, A. S. *et al.* *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nat. Commun.* **5**, 4913 (2014).

30. Fong, J. C. N., Syed, K. A., Klose, K. E. & Yildiz, F. H. Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology* **156**, 2757–2769 (2010).
31. Berk, V. *et al.* Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms. *Science* **337**, 236–239 (2012).
32. Kaplan, J. B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J. Dent. Res.* **89**, 205–218 (2010).
33. Seper, A. *et al.* Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation: Nucleases of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **82**, 1015–1037 (2011).
34. Binsztein, N. *et al.* Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7481–7486 (2004).
35. Jesudason, M. V., Balaji, V., Mukundan, U. & Thomson, C. J. Ecological study of *Vibrio cholerae* in Vellore. *Epidemiol. Infect.* **124**, 201–206 (2000).
36. Vaitkevicius, K. *et al.* The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*: Purification and properties. *FEBS J.* **275**, 3167–3177 (2008).
37. Vaitkevicius, K. *et al.* A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9280–9285 (2006).
38. Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G. B. & Sandstrom, G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*: *Vibrio cholerae* in amoebae. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 33–39 (2007).

39. Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C. & Blokesch, M. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J.* **10**, 897–910 (2016).
40. Box, A. M., McGuffie, M. J., O'Hara, B. J. & Seed, K. D. Functional Analysis of Bacteriophage Immunity through a Type I-E CRISPR-Cas System in *Vibrio cholerae* and Its Application in Bacteriophage Genome Engineering. *J. Bacteriol.* **198**, 578–590 (2016).
41. Barrangou, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).
42. Almagro-Moreno, S., Pruss, K. & Taylor, R. K. Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLOS Pathog.* **11**, e1004787 (2015).
43. Singh, Atheesha & Barnard, Tobias. G. Surviving the acid barrier: responses of pathogenic *Vibrio cholerae* to simulated gastric fluid. 815–824 (2016).
44. Faruque, S. M. *et al.* Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6350–6355 (2006).
45. Merrell, D. S. & Camilli, A. The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol. Microbiol.* **34**, 836–849 (1999).
46. Merrell, D. S., Bailey, C., Kaper, J. B. & Camilli, A. The ToxR-Mediated Organic Acid Tolerance Response of *Vibrio cholerae* Requires OmpU. *J. Bacteriol.* **183**, 2746–2754 (2001).
47. Boyer, J. L. Bile Formation and Secretion. in *Comprehensive Physiology* (ed. Terjung, R.) c120027 (John Wiley & Sons, Inc., 2013). doi:10.1002/cphy.c120027.
48. Gupta, S. & Chowdhury, R. Bile Affects Production of Virulence Factors and Motility

of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **4**.

49. Matson, J. S., Withey, J. H. & DiRita, V. J. Regulatory Networks Controlling *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression. *Infect. Immun.* **75**, 5542–5549 (2007).

50. Wibbenmeyer, J. A. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT Porins Are Differentially Affected by Bile. *Infect. Immun.* **70**, 121–126 (2002).

51. Booth, B. A., Boesman-Finkelstein, M. & Finkelstein, R. A. *Vibrio cholerae* Soluble Hemagglutinin/Protease Is a Metalloenzyme. *Infect Immun* **42**, 6 (1983).

52. Attridge, S.R & Rowley, D. The Role of the Flagellum in the Adherence of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*, **147**, 864–872 (1983).

53. Szabady, R. L., Yanta, J. H., Halladin, D. K., Schofield, M. J. & Welch, R. A. TagA is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins.

Microbiology **157**, 516–525 (2011).

54. Krachler, A. M., Ham, H. & Orth, K. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens.

Proc. Natl. Acad. Sci. **108**, 11614–11619 (2011).

55. Bhowmick, R. *et al.* Intestinal Adherence of *Vibrio cholerae* Involves a Coordinated Interaction between Colonization Factor GbpA and Mucin. *Infect. Immun.* **76**, 4968–4977 (2008).

56. Wong, E. *et al.* The *Vibrio cholerae* Colonization Factor GbpA Possesses a Modular Structure that Governs Binding to Different Host Surfaces. *PLoS Pathog.* **8**, e1002373 (2012).

57. Sperandio, V. & Kaper, J. B. The OmpU Outer Membrane Protein, a Potential Adherence Factor of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **63**, 6 (1995).

58. Aeckerberg, F., Lupp, C., Feliciano, B. & Ruby, E. G. *Vibrio fischeri* Outer

Membrane Protein OmpU Plays a Role in Normal Symbiotic Colonization. *J. Bacteriol.* **183**, 6590–6597 (2001).

59. Syed, K. A. *et al.* The *Vibrio cholerae* Flagellar Regulatory Hierarchy Controls Expression of Virulence Factors. *J. Bacteriol.* **191**, 6555–6570 (2009).

60. Millet, Y. A. *et al.* Insights into *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization from Monitoring Fluorescently Labeled Bacteria. *PLoS Pathog.* **10**, e1004405 (2014).

61. Zhu, J. *et al.* Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 3129–3134 (2002).

62. Nielsen, A. T. *et al.* A Bistable Switch and Anatomical Site Control *Vibrio cholerae* Virulence Gene Expression in the Intestine. *PLoS Pathog.* **6**, e1001102 (2010).

63. Nielsen, A. T. *et al.* RpoS Controls the *Vibrio cholerae* Mucosal Escape Response. *PLoS Pathog.* **2**, e109 (2006).

64. Cross, A. S. What is a virulence factor? *Crit. Care* **12**, 197 (2008).

65. Lonngren, I. & Holmgren, J. Subunit Structure of Cholera Toxin. *J. Gen. Microbiol.* **76**, 417–427 (1973).

66. Bharati, Kaushik & Ganguly, Nirmal. Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. *The Indian journal of medical research* **133**, 179-187 (2011).

67. Davis, B. M., Moyer, K. E., Boyd, E. F. & Waldor, M. K. CTX Prophages in Classical Biotype *Vibrio cholerae*: Functional Phage Genes but Dysfunctional Phage Genomes. *J. Bacteriol.* **182**, 6992–6998 (2000).

68. Kim, E. J. *et al.* Replication of *Vibrio cholerae* classical CTX phage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 2343–2348 (2017).

69. Holmgren, J. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera.

Nature **292** 413–417 (1981).

70. Fishman, PH. Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *Journal of Membrane Biologic* **69**, 85–97 (1982).

71. Field, M., Fromm, D., Al-Awqati, Q. & Greenough, W. B. Effect of Cholera Enterotoxin on Ion Transport across Isolated Ileal Mucosa. *J. Clin. Invest.* **51**, 796–804 (1972).

72. Li, J. *et al.* Vibrio cholerae Toxin-Coregulated Pilus Structure Analyzed by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Structure* **16**, 137–148 (2008).

73. Rhine, J. A. & Taylor, R. K. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 Vibrio cholerae. *Mol. Microbiol.* **13**, 1013–1020 (1994).

74. Rajanna, C. *et al.* The Vibrio Pathogenicity Island of Epidemic Vibrio cholerae Forms Precise Extrachromosomal Circular Excision Products. *J. Bacteriol.* **185**, 6893–6901 (2003).

75. Echazarreta, M. A. & Klose, K. E. Vibrio Flagellar Synthesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 131 (2019).

76. Provenzano, D. & Klose, K. E. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes Vibrio cholerae bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 10220–10224 (2000).

77. Beceiro, A., Tomas, M. & Bou, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 185–230 (2013).

78. Mohammed, Y., Aboderin, A. O., Okeke, I. N. & Olayinka, A. T. Antimicrobial resistance of Vibrio cholerae from sub-Saharan Africa: A systematic review. *Afr. J. Lab. Med.* **7**(2):778 (2018).

79. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Human Bacterial Pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* (2006) doi:10.21775/cimb.008.011.
80. Childers, Brandon M & Klose, Karl E. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon. *Future Microbiology* N°3, 335-44 (2007).
81. Kovacicova, G., Lin, W. & Skorupski, K. The Virulence Activator AphA Links Quorum Sensing to Pathogenesis and Physiology in *Vibrio cholerae* by Repressing the Expression of a Penicillin Amidase Gene on the Small Chromosome. *J. Bacteriol.* **185**, 4825–4836 (2003).
82. Miller, M. B. Quorum Sensing in Bacteria. *37*, 55:165-99 (2001).
83. Cámara, M., Hardman, A., Williams, P. & Milton, D. Quorum sensing in *Vibrio cholerae*. 217-218 (2002).
84. Kamareddine, L. *et al.* Activation of *Vibrio cholerae* quorum sensing promotes survival of an arthropod host. *Nat. Microbiol.* **3**, 243–252 (2018).
85. Lenz, D. H. *et al.* The Small RNA Chaperone Hfq and Multiple Small RNAs Control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**, 69–82 (2004).
86. Boyaci, H. *et al.* Structure, Regulation, and Inhibition of the Quorum-Sensing Signal Integrator LuxO. *PLOS Biol.* **14**, e1002464 (2016).
87. Leung, D. T., Chowdhury, F., Calderwood, S. B., Qadri, F. & Ryan, E. T. Immune responses to cholera in children. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **10**, 435–444 (2012).
88. Nalin, D. Cholera, Non-Vibrio Cholera, and Stomach Acid. *The Lancet* **312**, 856–859 (1978).
89. Singh, A. & Barnard, T. G. Surviving the acid barrier: responses of pathogenic *Vibrio cholerae* to simulated gastric fluid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 815–824 (2016).

90. Fiorucci, S., Biagioli, M., Zampella, A. & Distrutti, E. Bile Acids Activated Receptors Regulate Innate Immunity. *Front. Immunol.* **9**, 1853 (2018).
91. Kong, S., Zhang, Y. H. & Zhang, W. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Res. Int.* **2018**, 1–10 (2018).
92. Allaire, J. M. *et al.* The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* **39**, 677–696 (2018).
93. Bergstrom, K. S. B. *et al.* Muc2 Protects against Lethal Infectious Colitis by Disassociating Pathogenic and Commensal Bacteria from the Colonic Mucosa. *PLoS Pathog.* **6**, e1000902 (2010).
94. Kawashima, R. *et al.* IL-13 Receptor $\alpha 2$ Promotes Epithelial Cell Regeneration From Radiation–Induced Small Intestinal Injury in Mice. *Gastroenterology* **131**, 130–141 (2006).
95. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836 (2017).
96. Rinninella, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**, 14 (2019).
97. Rajakovich, L. J. & Balskus, E. P. Metabolic functions of the human gut microbiota: the role of metalloenzymes. *Nat. Prod. Rep.* **36**, 593–625 (2019).
98. Mullineaux-Sanders, Caroline *et al.* *Citrobacter rodentium* Relies on Commensals for Colonization of the Colonic Mucosa. *Cell Rep* **21**, 3381–3389 (2017).
99. Dudek-Wicher, R. K., Junka, A. & Bartoszewicz, M. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Gastroenterol. Rev.* **13**, 85–92 (2018).
100. You, J. S. *et al.* Commensal-derived metabolites govern *Vibrio cholerae* pathogenesis in host intestine. *Microbiome* **7**, 132 (2019).

101. Kommineni, S. *et al.* Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature* **526**, 719–722 (2015).
102. Conway, T. & Cohen, P. S. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol. Spectr.* **3**, (2015).
103. Marteyn, B. *et al.* Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**, 355–358 (2010).
104. von Frieling, J. *et al.* Grow With the Challenge – Microbial Effects on Epithelial Proliferation, Carcinogenesis, and Cancer Therapy. *Front. Microbiol.* **9**, 2020 (2018).
105. Leshner, S, Walburg Jun, H.E & Sacher Jun, G. A. Generation Cycle in the Duodenal Crypt Cells of Germ-Free and Conventional Mice. *Nature* **202** 884–886 (1964).
106. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200 (2016).
107. Bäumlner, A. J. & Sperandio, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**, 85–93 (2016).
108. Tan, Jian *et al.* Chapter Three- The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in Immunology* **121**, 91–119 (2014).
109. Hsiao, A. *et al.* Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature* **515**, 423–426 (2014).
110. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. & Lotfipour, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 723–736 (2012).
111. Dicks, L. M. T., Dreyer, L., Smith, C. & van Staden, A. D. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut–Blood Barrier?

Front. Microbiol. **9**, 2297 (2018).

112. Ran, R., Zeng, H., Zhao, D., Liu, R. & Xu, X. The Novel Property of Heptapeptide of Microcin C7 in Affecting the Cell Growth of *Escherichia coli*. *Molecules* **22**, 432 (2017).

113. Masuda, Y, Zendo, T & Sonomoto, K. New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. *Benef Microbes* **1**, 3–12 (2012).

114. Smith, L. & Hillman, J. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 401–408 (2008).

115. Begley, M., Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. Identification of a Novel Two-Peptide Lantibiotic, Lichenicidin, following Rational Genome Mining for LanM Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5451–5460 (2009).

116. Libertucci, Josie & Young, Vincent B. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nature Microbiology* **4**, 35–45 (2019).

117. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3–S23 (2010).

118. Sahai, J & Louie, SG. Overview of the immune and hemotopoietic systems. *Am J Hosp Pharm* S4-9 (1993).

119. LeibundGut-Landmann, S., Weidner, K., Hilbi, H. & Oxenius, A. Nonhematopoietic Cells Are Key Players in Innate Control of Bacterial Airway Infection. *J. Immunol.* **186**, 3130–3137 (2011).

120. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 2377–2392 (2009).

121. Shin, O. S. *et al.* LPLUNC1 Modulates Innate Immune Responses to *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **204**, 1349–1357 (2011).

122. Qadri, F. Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut* **53**, 62–69 (2004).
123. Qadri, F. *et al.* Increased Levels of Inflammatory Mediators in Children and Adults Infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Clin. Vaccine Immunol.* **9**, 221–229 (2002).
124. Queen, J., Agarwal, S., Dolores, J. S., Stehlik, C. & Satchell, K. J. F. Mechanisms of Inflammasome Activation by *Vibrio cholerae* Secreted Toxins Vary with Strain Biotype. *Infect. Immun.* **83**, 2496–2506 (2015).
125. Bandyopadhyaya, A. & Chaudhuri, K. Differential modulation of NF- κ B-mediated pro-inflammatory response in human intestinal epithelial cells by *cheY* homologues of *Vibrio cholerae*. *Innate Immun.* **15**, 131–142 (2009).
126. Toma, C. *et al.* Pathogenic *Vibrio* Activate NLRP3 Inflammasome via Cytotoxins and TLR/Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Mediated NF- κ B Signaling. *J. Immunol.* **184**, 5287–5297 (2010).
127. Harris, J. B. *et al.* Immunologic Responses to *Vibrio cholerae* in Patients Co-Infected with Intestinal Parasites in Bangladesh. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e403 (2009).
128. Büchau, A. S. *et al.* The Host Defense Peptide Cathelicidin Is Required for NK Cell-Mediated Suppression of Tumor Growth. *J. Immunol.* **184**, 369–378 (2010).
129. Shirin, Tahmina *et al.* Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection* **13**, 1111–1120 (2011).
130. Hoover, David, Chertov, Oleg & Lubkowski, Jacek. The Structure of Human B-Defensin-1. *J Biol Chem* **276**, 39021–39026 (2001).

131. Oppenheim, J. J. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 1711–1721 (2003).
132. Yokoi, Y. *et al.* Paneth cell granule dynamics on secretory responses to bacterial stimuli in enteroids. *Sci. Rep.* **9**, 2710 (2019).
133. Ouellette, A. J. Paneth cell α -defensins in enteric innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2215–2229 (2011).
134. Xhindoli, D. *et al.* The human cathelicidin LL-37 — A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1858**, 546–566 (2016).
135. van Harten, R., van Woudenberg, E., van Dijk, A. & Haagsman, H. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines* **6**, 63 (2018).
136. Mookherjee, Neelofar, Brown, Kelly L & Hancock, Robert E.W. Cathelicidins. in *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)* vol. 2 77–84.
137. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S33–S40 (2010).
138. Bhuiyan, T. R. *et al.* Cholera Caused by *Vibrio cholerae* O1 Induces T-Cell Responses in the Circulation. *Infect. Immun.* **77**, 1888–1893 (2009).
139. Patel, S. M. *et al.* Memory B Cell Responses to *Vibrio cholerae* O1 Lipopolysaccharide Are Associated with Protection against Infection from Household Contacts of Patients with Cholera in Bangladesh. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 842–848 (2012).
140. Use of antibiotics for cholera_ World Health Organization. (2014).
141. Leibovici-Weissman, Y. *et al.* Antimicrobial drugs for treating cholera. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2014) doi:10.1002/14651858.CD008625.pub2.

142. Kitaoka, M., Miyata, S. T., Unterweger, D. & Pukatzki, S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* **60**, 397–407 (2011).
143. Yang, D, Chertov, J & Oppenheim, J. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 978–989 (2001).
144. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. & Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, (2016).
145. Zharkova, M. S. *et al.* Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics—A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 128 (2019).
146. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. & Straus, S. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* **8**, 4 (2018).
147. Bechinger, B. & Gorr, S.-U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J. Dent. Res.* **96**, 254–260 (2017).
148. Schmidt, N. W. & Wong, G. C. L. Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: Geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **17**, 151–163 (2013).
149. Sani, Marc-Antoine & Separovic, Frances. How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. *Acc. Chem. Res* **49**, 1130–1138 (2016).
150. Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L. C. & Maffia, P. C. Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics. *Front. Chem.* **6**, 204 (2018).

151. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 55-70 (1999).
152. Hermesen, Elizabeth D, Sullivan, Christopher J & Rotschafer, John C. Polymixins: Pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infectious Disease Clinics of North America* **17**, 545–562 (2003).
153. Vaara, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiol Rev* **56**, 17 (1992).
154. Huang, Y., Huang, J. & Chen, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell* **1**, 143–152 (2010).
155. Avedissian, S. N. *et al.* A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. *Antibiotics* **8**, 31 (2019).
156. Hale, John DF & Hancock, Robert E.W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **5**, 951–959 (2014).
157. Vega, L. A. & Caparon, M. G. Cationic antimicrobial peptides disrupt the *Streptococcus pyogenes* ExPortal: Polymyxin B and HNP-1 disrupt the ExPortal. *Mol. Microbiol.* **85**, 1119–1132 (2012).
158. Le, C.-F., Fang, C.-M. & Sekaran, S. D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02340-16, /aac/61/4/e02340-16.atom (2017).
159. Delgado, M. A., Rintoul, M. R., Farias, R. N. & Salomon, R. A. Escherichia coli RNA Polymerase Is the Target of the Cyclopeptide Antibiotic Microcin J25. *J. Bacteriol.* **183**,

4543–4550 (2001).

160. Wilson, K.-A. *et al.* Structure of Microcin J25, a Peptide Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase, is a Lassoed Tail. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12475–12483 (2003).

161. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238–250 (2005).

162. Nijnik, A. & Hancock, R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg. Health Threats J.* **2**, (2009).

163. Kang, H. K., Lee, H. H., Seo, C. H. & Park, Y. Antimicrobial and Immunomodulatory Properties and Applications of Marine-Derived Proteins and Peptides. *Mar. Drugs* **17**, 350 (2019).

164. Destoumieux-Garzón, D., Duperthuy, M., Vanhove, A., Schmitt, P. & Wai, S. Resistance to Antimicrobial Peptides in Vibrios. *Antibiotics* **3**, 540–563 (2014).

165. Mathur, J. & Waldor, M. K. The *Vibrio cholerae* ToxR-Regulated Porin OmpU Confers Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infect. Immun.* **72**, 3577–3583 (2004).

166. Mathur, J., Davis, B. M. & Waldor, M. K. Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* ^E regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Mol. Microbiol.* **63**, (2007).

167. Duperthuy, M., Binesse, J. & Destoumieux-Garzon, D. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental microbiology* **4**, 951-63(2010).

168. Joo, H.-S., Fu, C.-I. & Otto, M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial

peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 0006-2015 (2016).

169. Cole, J. N. & Nizet, V. Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).

170. Henderson, J. C. *et al.* Antimicrobial Peptide Resistance of *Vibrio cholerae* Results from an LPS Modification Pathway Related to Nonribosomal Peptide Synthetases. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2382–2392 (2014).

171. Matson, J. S., Livny, J. & DiRita, V. J. A putative *Vibrio cholerae* two-component system controls a conserved periplasmic protein in response to the antimicrobial peptide polymyxin B. *PLOS One* **12**, e0186199 (2017).

172. Herrera, C. M. *et al.* The *Vibrio cholerae* VprA-VprB Two-Component System Controls Virulence through Endotoxin Modification. *mBio* **5**, e02283-14 (2014).

173. Bilecen, K. *et al.* Polymyxin B Resistance and Biofilm Formation in *Vibrio cholerae* Are Controlled by the Response Regulator CarR. *Infect. Immun.* **83**, 1199–1209 (2015).

174. Anand, D. & Chaudhuri, A. Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Mol. Membr. Biol.* **33**, 125–137 (2016).

175. Duperthuy, M. *et al.* Role of the *Vibrio cholerae* Matrix Protein Bap1 in Cross-Resistance to Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathog.* **9**, e1003620 (2013).

176. Rompikuntal, P. K. *et al.* Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholerae*. *PLOS ONE* **10**, e0134098 (2015).

177. Meno, Y., Waldor, M. K., Mekalanos, J. J. & Amako, K. Morphological and physical characterization of the capsular layer of *Vibrio cholerae* O139. *Arch. Microbiol.* **170**, 339–344 (1998).

178. Willis, L. M. & Whitfield, C. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular

polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr. Res.* **378**, 35–44 (2013).

179. Campos, M. A. *et al.* Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infect. Immun.* **72**, 7107–7114 (2004).

180. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* **12**, 5-16 (2001).

181. Cros, Candice. L'étude des antimicrobiens comme modulateurs du Système de Sécrétion de Type VI de *Vibrio cholerae*. Mémoire de maîtrise (2019).

182. Baquero, F., Lanza, V. F., Baquero, M.-R., del Campo, R. & Bravo-Vázquez, D. A. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front. Microbiol.* **10**, 2261 (2019).

183. Palacios, J. *et al.* Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Microbiol. Res.* **154**, 199–204 (1999).

184. Orwa, J. A. *et al.* Isolation and structural characterization of polymyxin B components. *J. Chromatogr. A* **912**, 369–373 (2001).

185. Martinez, R. M., Megli, C. J. & Taylor, R. K. Growth and Laboratory Maintenance of *Vibrio cholerae*. *Curr. Protoc. Microbiol.* **17**, 6A.1.1-6A.1.7 (2010).

186. Pohlner, J., Meyer, T. F., Jalajakumari, M. B. & Manning, P. A. Nucleotide sequence of *ompV*, the gene for a major *Vibrio cholerae* outer membrane protein. *MGG Mol. Gen. Genet.* **205**, 494–500 (1986).

187. Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. & Schneider, D. S. A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathog.* **3**, e26 (2007).

188. Blow, N. S. *et al.* *Vibrio cholerae* Infection of *Drosophila melanogaster* Mimics the

Human Disease Cholera. *PLoS Pathog.* **1**, e8 (2005).

189. Giacomucci, S., Cros, C. D.-N., Perron, X., Mathieu-Denoncourt, A. & Duperthuy, M. Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae*. *PLOS One* **14**, e0221431 (2019).

190. Heidelberg, J. F. *et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477–483 (2000).